

# Über Pflanzenfermente.

Von

**W. W. Bialosuknia.**

---

(Aus dem chemischen Laboratorium des Kaiserl. Instituts für experimentelle Medizin  
in St. Petersburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 5. Dezember 1908.)

---

Die Literatur über den Enzymgehalt der Pflanzengewebe und besonders der Keime ist reich an widersprechenden Angaben.

Nach der Ansicht von Krauch<sup>1)</sup> und Neumeister<sup>2)</sup> fehlen die Fermente in den nicht gekeimten Samen. Krauch geht in dieser Hinsicht soweit, daß er überhaupt das Vorhandensein von Fermenten in den Pflanzen nicht anerkennt. C. Fermi und Buscaglioni<sup>3)</sup> fanden bei verschiedenen Pflanzenarten ein Ferment, welches die Gelatine verflüssigt, z. B. bei der Gattung der Artocoripeen, Euphorbiaceen, dann bei Convolvulaceen und Asclepiadeen, dagegen fehlte dieses Ferment bei den Papaveraceen, Fumariaceen und Compositen. Die Verflüssigung der Gelatine durch das Malz wurde zuerst von Fernbach und Hubert<sup>4)</sup> untersucht. In seiner Arbeit über die proteolytischen Malzfermente berührt Weiss<sup>5)</sup> auch die Frage der quantitativen Zersetzung des Pflanzeneiweißes durch Malzextrakt. In einer Reihe von Versuchen gelang es ihm, im Malz die Anwesenheit eines auf Pflanzeneiweiß proteolytisch wirkenden Fermentes zu konstatieren. Seine Versuche waren sowohl bei aseptischen als auch bei antiseptischen Versuchsbedingungen ausgeführt.

---

<sup>1)</sup> Krauch, Landwirtschaftl. Versuchsst., Bd. XXIII, S. 78; Bd. XXVII, S. 383.

<sup>2)</sup> Neumeister, Zeitschrift f. Biologie, Bd. XXX, S. 447.

<sup>3)</sup> Fermi und Buscaglioni, Bakter. Zentralbl., II. Abt., 1899.

<sup>4)</sup> Fernbach und Hubert, Comptes rendus, Bd. CXXX, S. 1783; Bd. CXXX, S. 293 (1900).

<sup>5)</sup> Weiss, Diese Zeitschrift, Bd. XXXI (1900), S. 79.

Über die Technik und Anordnung dieser Versuche wird bei der Beschreibung meiner Resultate weiter unten die Rede sein. Bokorny<sup>1)</sup> fand eine trypsinähnliche Fermentwirkung in den durchwachsenen Samen von *Pinus montana*, dagegen fehlten in denselben pepsinähnliche Fermente. Gorup-Beanez<sup>2)</sup> isolierte aus der Wicke ein Ferment, welches bei Anwesenheit von Salzsäure Fibrin auflöste. Hansen<sup>3)</sup> dagegen, welcher in derselben Richtung arbeitete, erhielt negative Resultate und leugnet deswegen die Anwesenheit dieses Fermentes.

Im Herbst des vorigen Jahres unternahm ich auf lebenswürdige Anregung von Frau Dr. N. O. Sieber Untersuchungen über Pflanzenfermente; speziell beschäftigte ich mich mit der Frage, welche Fermente überhaupt in Getreide- und Futterpflanzen, sowie in ihren Samen und beim Auskeimen derselben vorkommen. Die Frage nach dem Gehalt der Fermente in den Samen der verschiedenen Gräser, hauptsächlich der Futter- und Getreidepflanzen, ist bis jetzt wenig ausgearbeitet. Einige Fermente dieser Pflanzenarten sind schon untersucht worden, über andere dagegen sind unsere Kenntnisse sehr gering.

Meine Untersuchungen führte ich an folgenden Samen aus: Aus der Ordnung der Papilionaceae nahm ich die Samen von *Trifolium pratense*, *T. repens*, *T. hybridum*, *Vicia sativa*, *Ornithopus sativus*. Aus der Ordnung der Gramineen wurden *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Alopecurus pratensis*, *Agrostis stolonifera*, *Avena elatior*, *A. sativa*, *Secale cereale*, *Hordeum distichon*, *Panicum* und *Triticum pratense* untersucht. Die genannten Samen wurden als solche und außerdem in den verschiedenen Stadien des Auskeimens auf fertige Fermente und auf eventuell vorkommende Zymogene untersucht. Außerdem beabsichtigten wir, die Rolle der Fermente in der reifen Pflanze zu studieren. Bis jetzt habe ich in den genannten Samen drei Gruppen von

---

<sup>1)</sup> Bokorny, Pflügers Archiv, Bd. XC, S. 102 (1902).

<sup>2)</sup> Gorup-Besanez, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. VII, S. 1478; Bd. VIII, S. 1570.

<sup>3)</sup> Hansen, Arbeiten d. botanisch. Instituts in Würzburg, Bd. III, S. 279.

Fermenten untersucht: 1. die proteolytischen, 2. die saccharifizierenden und 3. die oxydierenden Fermente. Die Untersuchungen über fettspaltende und andere Fermente werden noch fortgeführt. Die von mir gewonnenen Resultate, die drei genannten Gruppen der Fermente betreffend, möchte ich jetzt noch vor der Beendigung der Untersuchungen mitteilen, weil ich genötigt bin, auf einige Zeit meine Untersuchungen zu unterbrechen, und weil in der letzten Zeit eine Reihe von Arbeiten in derselben Richtung erschienen ist.

### Die Methodik.

Zur Untersuchung der fermentativen Eigenschaften wurden die Samen zuerst mit Hilfe einer Mühle in ein feinstes Pulver zerrieben, welches dann durch ein Sieb, deren Öffnungen = 0,1 mm waren, gesiebt wurde. Das auf diese Weise erhaltene Pulver wurde in Vacuo über Schwefelsäure bis zu konstantem Gewicht getrocknet. Alle Versuche wurden in sterilen Gefäßen mit vorher sterilisierten Lösungen bei 37,5° C. angestellt. Als Antiseptica wurde Chloroform mit Thymol vermischt angewandt, nur bei den Untersuchungen der oxydierenden Fermente war Thymol ausgeschlossen.

### I. Proteolytische Fermente.

Zur Untersuchung nahm ich je 0,1 der bis zu konstantem Gewicht getrockneten Pulver der verschiedenen Samen und vermischte sie 1. mit 5 ccm Wasser, 2. mit 5 ccm 0,2% iger Alkalilösung und 3. mit 5 ccm 0,2% iger Salzsäurelösung.

Die Fermente wurden untersucht auf ihre Wirkung auf Eiereiweiß nach Mett, auf Fibrin und auf sterilisierte Milch.

#### Versuche mit Eiereiweiß nach Mett.

Die Versuche wurden in breiten Reagenzgläschen mit immer frisch bereiteten Eiereiweißröhrchen ausgeführt. Jedes Reagenzglas enthielt zwei Mettröhrchen von 1 cm Länge, 0,1 g Samenpulver und 5 ccm einer neutralen, alkalischen oder sauren Lösung mit 5 Tropfen Chloroform. Die Versuchsdauer war 10 Stunden. Für Kontrollzwecke wurden die Versuche dann noch während 36 Stunden fortgeführt.

*Versuch I.* Bei folgenden Samen wurde keine Wirkung beobachtet: *Vicia sativa*, *Trifolium pratense*, *T. repens*, *T. hybridum*, *Avena sativa*, *Secale cereale*, *Triticum pratense*, *Panicum Phleum pratense*, weder in neutraler, noch in alkalischer, noch in saurer Lösung (wie oben bereitet).

*Versuch II.* 0,2 g Samenpulver + 6 ccm Flüssigkeit + 1 ccm Glycerin + 5 Tropfen Chloroform. Keine Wirkung in 3 Tagen.

*Versuch III mit Darmsaft.* 0,1 g Samenpulver + 5 ccm 0,2% ige KOH + 5 Tropfen Chloroform + 1—2 Tropfen Darmsaft. Der Versuch dauerte 10 Stunden. Keine Wirkung bei *Trifolium pratense*, *T. repens*, *hybridum* und *Vicia sativa*, das Eiweiß wird durchsichtig bei *Vicia protens*, *Avena sativa*, *Secale cereale* und *Phleum pratense*.

### Die Verdauung des Fibrins.

*Versuch IV.* 0,1 g Samenpulver + 5 ccm Flüssigkeit + 5 Tropfen Chloroform + 1 Stückchen Fibrin. Die Versuche dauerten 10 Stunden.

|                             | H <sub>2</sub> O | KOH<br>0,1 % | KOH<br>0,2 % | HCl<br>0,1 % | HCl<br>0,2 % | Bemerkungen  |
|-----------------------------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--|
| <i>Trifolium pratense</i> . | 0                | 0            | +            | 0            | 0            | In Kontrollversuchen mit 0,2% KOH war das Fibrin fast ganz aufgelöst, die Biuretreaktion war aber negativ. In den Gläschen mit den Samenpulvern, in denen eine Auflösung von Fibrin beobachtet wurde, war die Biuretreaktion deutlich. |
| » <i>repens</i> .           | 0                | 0            | +            | 0            | 0            |  |
| » <i>hybridum</i>           | 0                | +            | +            | 0            | 0            |  |
| <i>Vicia sativa</i> . . .   | 0                | 0            | 0            | 0            | 0            |  |
| <i>Ornithopus sativus</i>   | 0                | 0            | +            | 0            | 0            |  |
| <i>Avena sativa</i> . . .   | 0                | 0            | +            | 0            | 0            |  |
| <i>Hordeum distichon</i>    | 0                | 0            | +            | 0            | 0            |  |
| <i>Secale cereale</i> . .   | 0                | 0            | 0            | 0            | 0            |  |
| <i>Poa pratensis</i> . . .  | 0                | 0            | 0            | 0            | 0            |  |

0 bedeutet keine Wirkung; + Auflösung des Fibrins.

*Versuch V.* (Dauer 50 Stunden.) In einer schwächeren Alkalilösung (0,05% KOH), aber bei sonst gleichen Versuchs-

<sup>1)</sup> Den Darmsaft erhielt ich von Dr. E. Ganike aus dem physiol. Laboratorium des Prof. J. P. Pawlow, wofür ich beiden Herren an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank ausspreche.

bedingungen wurde das Fibrin durch die oben genannten Samen nicht verdaut. Biuretreaktion fehlte.

*Versuch VI. Milchgerinnung.* 0,15 g Samenpulver + 8 ccm bei 115° sterilisierter Milch + 5 Tropfen Chloroform. Die Versuche dauerten 10 Stunden. Zur Prüfung dienten die in Versuch V gewonnenen Species und außerdem *Triticum vulgare*. Überall Gerinnung, mit Ausnahme von *Secale cereale*, im letzteren Falle auch Biuretreaktion, die sonst fehlte.

*Versuch VII. Gelatineverdauung.* Es wurden 0,1 g Samenpulver mit 5 ccm 10%iger Gelatine und 5 Tropfen Chloroform vermischt. Die Versuche dauerten 10 Tage, es wurde keine Verflüssigung der Gelatine beobachtet.

Die Versuche VIII und IX, in welchen die Verdauungskraft von gekeimten Samen von *Trifolium pratense*, *Avena sativa* und *Secale cereale* auf Eiereiweiß und Fibrin untersucht wurde, führten sowohl in alkalischen, wie auch in sauren Lösungen zu negativen Resultaten. In Versuchen, in welchen die Einwirkung von *Avena sativa* auf Eiereiweiß in alkalischer Lösung untersucht wurde, wurde eine Quellung und ein Hervorragen des Eierweißes auf 1 mm aus den Mettschen Röhrchen beobachtet. Bei der Fibrinverdauung war die Biuretreaktion negativ.

#### Untersuchung der Samen auf Labferment.

*Versuch X (sterile Milch und gekeimte Samen).* Die Samen keimten 2 und 5 Tage aus. Für die Versuche nahm ich 0,15 g Samenpulver und 8 ccm Milch mit 5 Tropfen Chloroform. Versuchsdauer 10 Stunden. Zum Versuche dienten Samen von *Avena sativa*, *Trifolium pratense*, *Secale cereale* nach 2 und 5 tägiger Keimung. Überall Milchgerinnung. Biuretreaktion nur bei *Secale cereale* vorhanden.

Ferner wurden noch Versuche über die Verdauung von Pflanzeneiweiß, welches nach der Methode von Weiss<sup>1)</sup> aus Weizen- und Roggensamen gewonnen war, angestellt.

Nach dieser Methode wird der Roggen oder der Weizen mit 55%igem Alkohol extrahiert, das Alkoholextrakt zur Entfernung der

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXI (1900), S. 79.

Fette wiederholt gefroren und das Eiweiß zuletzt mit absolutem Alkohol gefällt, mit Alkohol und Äther gewaschen und dann in vacuo getrocknet. Das nach dieser Methode aus Weizen und Roggen erhaltene Eiweiß war ein weißes Pulver, welches in 0,4%iger Lösung der Milchsäure leicht, in Wasser dagegen schwer löslich war.

Für die Versuche wurden je 5 ccm einer 2%igen Lösung dieses Eiweißes mit 0,1 g Samenpulver vermischt und im Thermostaten bei 37,5 ° C. 2 oder 4 oder noch mehr Stunden stehen gelassen. Nach Beendigung der Versuche wurden in die Reagenzgläschen 5 ccm einer 5%igen Tanninlösung hinzugefügt und die Flüssigkeit bis zu einem gewissen Volumen mit Wasser aufgefüllt, worauf sie filtriert wurde. Vom Filtrate wurde in 25 ccm der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Die Kontrollversuche mit der Fällung des Eiweißes durch Tannin zeigten, daß die Filtrate keine Spuren Eiweiß enthielten, weil alles Eiweiß in der Tanninfällung enthalten war. Die Anwesenheit von Stickstoff in den Filtraten nach der Tanninfällung der Gemische, welche der proteolytischen Einwirkung der Samenfermente unterworfen waren, zeigte die stattgehabte Eiweißzersetzung unter dem Einfluß der Fermente an.

*Versuch XI.* 0,1 g Samenpulver + 5 ccm einer 2%igen Lösung von Weizeneiweiß in 0,4%iger Milchsäure. Versuchsdauer 2 Stunden. In dem Versuche mit rotem Klee (trif. prat.) fand ich 0,05305 g peptonisierten N, im Versuche mit Lämmerklee (trif. hybr.) 0,0357 g peptonisierten Stickstoff.

*Versuch XII.* 0,1 g Samenpulver + 5 ccm 2%iger Lösung von Weizeneiweiß in 4%iger Milchsäure. Versuchsdauer 4 Stunden.

|                 | Peptonisierter N |                | Peptonisierter N |
|-----------------|------------------|----------------|------------------|
| Trifol. prat.   | 0,0751 g         | Panic. mil.    | 0,0100 g         |
| Trifol. repens  | 0,0334 »         | Tritic. vulg.  | 0,0353 »         |
| Trifol. hybrid. | 0,0663 »         | Secal. cereal. | 0,0101 »         |
| Vicia sativa    | 0,0498 »         | Phleum prat.   | 0,0097 »         |
| Avena sativa    | 0,0141 »         |                |                  |

Zur Entscheidung der Frage, ob die Eiweißzersetzung auch in neutralen Lösungen stattfindet, wurden auch Versuche mit einer wässerigen Weizeneiweißlösung angestellt.

*Versuch XIII.* 0,1 g Samenpulver + 5 ccm einer Lösung von Weizeneiweiß in Wasser. Versuchsdauer 4 Stunden.

|                              |          |                  |           |
|------------------------------|----------|------------------|-----------|
| Mit <i>Trifolium pratens</i> | 0,0764 g | peptonisierter N | in Lösung |
| » <i>Tritic. vulgare</i>     | 0,0531 » | »                | » » »     |
| » <i>Phleum prat.</i>        | 0,0355 » | »                | » » »     |

*Versuch XIV. (Haferiweiß).* 0,1 g Samenpulver + 5 ccm einer wässrigen Haferiweißlösung. Versuchsdauer 4 Stunden.

|                              |          |                  |           |
|------------------------------|----------|------------------|-----------|
| Mit <i>Trifolium pratens</i> | 0,0764 g | peptonisierter N | in Lösung |
| » <i>Tritic. vulgare</i>     | 0,0353 » | »                | » » »     |
| » <i>Phleum prat.</i>        | 0,0399 » | »                | » » »     |

Die angeführten Untersuchungen zeigen, daß die Pflanzensamen sich tierischem Eiweiß gegenüber indifferent verhalten;

1. es fehlt sowohl in nicht gekeimten, als auch in gekeimten Samen irgend eine proteolytische Wirkung auf Eiereiweiß;

2. es blieb auch ohne Wirkung der Zusatz von Darmsaft, welcher zur Aktivierung des eventuell vorhandenen Zymogens des Fermentes hinzugefügt wurde;

3. das Fibrin wird nur in Gegenwart von 0,2%igem KOH verdaut, was durch den positiven Ausfall der Biuretreaktion bewiesen wird;

4. in allen auskeimenden und nicht auskeimenden Samen, außer den Roggensamen, ist ein dem Labferment ähnliches, die Milchgerinnung bewirkendes Enzym vorhanden.

Die Pflanzenfermente verhalten sich dagegen sehr aktiv gegen Pflanzeneiweiß, und ihre proteolytische Wirkung auf Hafer- und Weizeneiweiß äußert sich sowohl in saurer als auch in neutraler Lösung.

Die Verdauung von Pflanzeneiweiß geht, wie es scheint, in Gegenwart von 0,4%iger Milchsäure weniger energisch vor als in wässriger Lösung. Die Samen der Papilionaceen enthalten stärkere proteolytische Fermente, als die Samen der Gräser.

## II. Über den Gehalt der Pflanzensamen an oxydierenden Fermenten.

Zum Nachweis der Oxydasen und der Peroxydasen wurden die Samenpulver mit Wasser und mit 10%igem Glycerin in der Weise extrahiert, daß 0,5 g der Samenpulver in weiten Reagenzgläsern oder kleinen Kolben mit 20 ccm sterilem Wasser oder 20 ccm 10%igem Glycerin vermischt und bei 37,5° C.

während 12 Stunden stehen gelassen wurden. Darauf wurde die Flüssigkeit durch Filtrierpapier filtriert und das Filtrat auf den Gehalt an oxydierenden Fermenten geprüft. Zum Nachweis der oxydierenden Fermente wurden Guajaktinktur, 1<sup>o</sup>/<sub>o</sub>ige Guajakollösung, das Reagens von Roehmann und Spitzer, Benzidin und Pyrogallol angewandt.

Die Resultate der Versuche sind folgende:

1. Die Reaktion mittels Guajaktinktur auf sogenannte direkte Oxydase trat am ersten Keimungstage ein bei *Ornithopus sativus*, *Trifolium pratense*, *Phleum pratense*. Am 5. Tag erhielt ich die Reaktion bei *Hordeum vulgare*, *Secale cereale* und *Ornithopus sativus*; alle anderen Samen gaben negatives Resultat. 2. Die Reaktion mit Guajaktinktur und  $H_2O_2$  ist bei allen untersuchten Samen mit Ausnahme von *Trifolium* und *Agrostis stolonifera* schon am ersten Tage positiv. Am 5. Keimungstage überall positiv. 3. Die Reaktion mit 1<sup>o</sup>/<sub>o</sub>igem Gujakol tritt am 1. Tag bei *Trifolium* und *Vicia sativa* ein, am 5. Tage nur bei *Vicia sativa*, sonst überall negativ. 4. Die kombinierte Reaktion von 1<sup>o</sup>/<sub>o</sub>igem Gujakol und  $H_2O_2$  wurde am 1. Tage nur bei *Trifolium hybridum* und *Agrostis stolonifera* erhalten. Am 5. Tag dagegen gaben alle Samen positives Resultat. 5. Die Benzidinreaktion fiel in allen Fällen negativ aus. 6. Benzidin und  $H_2O_2$  verhielten sich am 1. Tag negativ bei *Ornithopus sativus*, den 3 *Trifolium*arten, *Vicia sativa* und *Phleum pratense*. Am 5. Tage war dagegen die Reaktion überall positiv, mit Ausnahme von *Trifolium pratense*. 7. Das Reagens von Roehmann und Spitzer erwies sich *Hordeum vulgare*, *Avena*, *Ornithopus sativus*, *Trifolium hybridum* und *repens*, *Vicia sativa* am 1. Tage negativ, im übrigen war es positiv. Am 5. Tag fiel die Reaktion nur mit 3 *Trifolium*arten und *Vicia sativa* positiv aus. 8. Pyrogallol gab stets ein negatives Resultat. 9. Pyrogallol und  $H_2O_2$  gaben am 1. Keimungstage nur mit Roggen und Weizen ein positives Resultat. Am 5. Tag gab es mit *Hordeum vulgare*, *Avena*, *Ornithopus sativus*, *Trifolium*, *Lolium perenne* einen positiven Ausfall der Reaktion,

hingegen war jetzt diese Reaktion bei Roggen und Weizen verschwunden.

Die Resultate dieser Versuche weisen auf eine gewisse individuelle Spezifität der Samen hinsichtlich der Verteilung der Fermente hin, indem verschiedene Samen verschiedene Fermente enthalten.

Über die Resultate werde ich später berichten. Hier sei nur erwähnt, daß man sie durch Wasser extrahieren und durch Fällung mit basischem Bleiacetat von einem großen Teil der eiweißartigen Beimengungen befreien kann.

Die intensivsten Reaktionen wurden beim Weizen beobachtet, weswegen ich auch versucht habe, die oxydierenden Fermente aus dem Weizen zu isolieren.

### III. Untersuchungen über den Gehalt an Diastasen.

Zum Nachweis der Fermente, welche in den oben genannten Samen die Stärke in Dextrin und Zucker überführen, wurden folgende Versuche angestellt, durch welche 1. die Schnelligkeit des Überganges der Stärke in das eine oder andere Dextrin und dann in Zucker und 2. die Art des erhaltenen Zuckers bestimmt werden sollte.

20 ccm eines 1%igen Stärkekleisters wurden in einer Reihe von sterilisierten Kölbchen mit 0,5 g des bis zu einem konstanten Gewicht getrockneten Samenpulvers vermischt, die Kölbchen mit sterilen Wattepfropfen verstopft und nach Zusatz von etwas Thymol in den Thermostaten (37° C.) gestellt.

Zum Nachweis des Überganges von Stärke in Dextrin entnahm ich in gewissen Zeiträumen mit einer sterilen Pipette aus den Kölbchen 0,25 ccm Flüssigkeit und bestimmte in den einzelnen Portionen den Gehalt an Stärke, an Dextrin und an Zucker. In die Reagenzgläser mit 0,25 ccm der Flüssigkeit brachte ich je 5 ccm Wasser und zum Nachweis der Dextrine je einen Tropfen einer  $n/10$ -Jodlösung. Für den Zuckernachweis wurden die Lösungen von Fehling und von Barfoed angewandt. Anfangs entnahm ich die Proben den Kölbchen alle 7 Stunden, später alle 24 Stunden. Der allmähliche Übergang der Stärke in Dextrin und Zucker wird durch die folgende Tabelle illustriert.

Tabelle I.

20 ccm 1%ige Lösung der Kartoffelstärke + 0,5 g gepulverte Samen.

| Benennung der Samen           | Stunden |   |   |   |   |   |   |    | Tage |   |   |   |   |   |   |  |
|-------------------------------|---------|---|---|---|---|---|---|----|------|---|---|---|---|---|---|--|
|                               | 1       | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 24 | 2    | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |  |
| <i>Trifolium pratense</i> .   | S       | S | S | S | E | S | S | S  | E    | B | 0 | 0 | 0 | B |   |  |
| » <i>repens</i> . .           | S       | E | E | E | E | E | E | E  | E    | E | 0 | 0 | 0 | 0 | B |  |
| » <i>hybridum</i>             | S       | S | S | S | S | E | E | S  | S    | S | B | 0 | 0 | 0 | B |  |
| <i>Vicia sativa</i> . . .     | S       | S | S | E | E | E | E | E  | E    | B | 0 | 0 | B |   |   |  |
| <i>Ornithopus sativus</i>     | E       | E | E | E | E | E | E | E  | E    | B |   |   |   |   |   |  |
| <i>Phleum pratense</i> .      | S       | E | E | E | E | E | E | S  | B    | B |   |   |   |   |   |  |
| <i>Lolium perenne</i> . .     | S       | S | E | S | S | S | S | S  | B    | B |   |   |   |   |   |  |
| <i>Poa pratensis</i> II .     | E       | E | E | E | E | E | E | S  | E    | B |   |   |   |   |   |  |
| <i>Alopecurus pratensis</i>   | S       | S | E | E | E | E | E | B  |      |   |   |   |   |   |   |  |
| <i>Agrostis stolonifera</i> I | E       | E | E | S | S | E | E | S  | B    |   |   |   |   |   |   |  |
| <i>Avena elatior</i> . . .    | E       | E | E | E | E | E | E | S  | B    |   |   |   |   |   |   |  |
| <i>Panicum</i> . . . . .      | S       | S | E | E | E | E | E | E  | B    |   |   |   |   |   |   |  |
| <i>Hordeum vulgare</i> .      | E       | E | E | E | E | E | E | B  |      |   |   |   |   |   |   |  |
| <i>Avena sativa</i> . . .     | E       | S | E | E | E | E | E | B  |      |   |   |   |   |   |   |  |
| <i>Secale cereale</i> . .     | S       | S | S | S | E | E | E | S  | B    |   |   |   |   |   |   |  |
| <i>Triticum solan.</i> . .    | E       | S | S | E | E | E | E | B  |      |   |   |   |   |   |   |  |

S bedeutet Stärkereaktion (d. h. Blaufärbung mit Jod).

E » Erythrodextrin (» » Rotfärbung » »).

B » Eintritt der Reduktion mit dem Barfoedschen Reagens.

Der Übergang der Stärke in Dextrin geht zuerst, wie die angeführte Tabelle zeigt, ziemlich energisch vor sich, dann tritt aber ein Moment ein, wo die in der vorhergehenden Probe bereits verschwundene Stärkereaktion wieder erscheint. Der Reaktionsverlauf ist folgender: Die anfängliche blaue Färbung der Flüssigkeit geht allmählich in rotviolett über, was das Auftreten von Erythrodextrin anzeigt. Nach einiger Zeit tritt die blaue Färbung wieder auf, um dann nach einem kürzeren oder längeren Zeitraum wieder zu verschwinden. Bei einigen Samenarten, wie z. B. bei *Lolium perenne*, wurde die blaue Stärkereaktion während 5 Stunden nach ihrem Wiedererscheinen be-

obachtet. Dieser Versuch wurde mehrmals mit demselben Resultate wiederholt. Es war interessant zu untersuchen, ob in diesem Falle eine reversible Reaktion, d. h. eine Synthese der Stärke stattfindet, zu deren Zustandekommen ein gewisses Mengenverhältnis der Stoffe, zwischen denen die Reaktion vor sich geht, notwendig ist. Die Veränderung der Verhältnisse wird am leichtesten mittels der Verdünnung erreicht. Zu diesem Zwecke wurden 20 ccm der 1%igen Stärkelösung mit 20, 40, 60 und 80 ccm sterilisierten Wassers verdünnt. Hierbei ergab sich eine Verzögerung des Überganges der Stärke in Dextrin und Zucker und keine nachträgliche Blaufärbung. Die Reduktion des Barfoedschen Reagens, welches die Zuckerbildung anzeigt, wurde erst am 10. Versuchstage beobachtet. Bei den weiteren Verdünnungen fehlte überhaupt die Zuckerbildung, sowie auch die umgekehrte Reaktion auf Stärke, trotz der langen Versuchsdauer. In parallelen Versuchen (Tab. II) mit konzentrierten Stärkelösungen (2%igen, 3%igen und 4%igen Stärkelösungen) trat die umgekehrte Reaktion auf Stärke auf, wenn auch weniger regelmäßig und weniger stark als bei 1%igen Stärkelösungen.

Tabelle II.

20 ccm 2-, 3- und 4%ige Stärkelösung + 0,5 g Samen.

| Benennung der Samen | 1 Stunde  |     |     | 2 Stunden |     |     | 3 Stunden |     |     | 4 Stunden |     |     |
|---------------------|-----------|-----|-----|-----------|-----|-----|-----------|-----|-----|-----------|-----|-----|
|                     | 2 %       | 3 % | 4 % | 2 %       | 3 % | 4 % | 2 %       | 3 % | 4 % | 2 %       | 3 % | 4 % |
| Trifolium pratense  | S         | S   | S   | E         | S   | S   | E         | S   | S   | S         | E   | S   |
|                     | 5 Stunden |     |     | 6 Stunden |     |     | 7 Stunden |     |     |           |     |     |
|                     | E         | E   | S   | E         | S   | S   | E         | S   | E   |           |     |     |

Da bei den Versuchen mit den Samen von *Ornithopus sativus* die Umwandlung der Stärke in Dextrin sehr rasch, schon innerhalb einer Stunde, vor sich geht, so führte ich eine Reihe von Versuchen mit diesen Samen aus, um den Anfang und das Ende der Stärkeumwandlung festzustellen. Diese Ver-

suche, bei denen die Proben zur Untersuchung alle 5 Minuten entnommen wurden, sind in der Tabelle III angeführt.

Tabelle III.

0,5 g gepulverter Samen + 20 ccm 1%ige Kartoffelstärke.

| Benennung<br>der Samen | Zeit in Minuten    |                    |    |    |                 |    |    |                  |    |
|------------------------|--------------------|--------------------|----|----|-----------------|----|----|------------------|----|
|                        | 5                  | 10                 | 15 | 20 | 25              | 30 | 35 | 40               | 45 |
| Ornithopus<br>sativus  | S                  | S                  | S  | S  | S               | S  | S  | Grüne<br>Färbung | E  |
|                        | Zeit in Minuten    |                    |    |    |                 |    |    |                  |    |
|                        | 50                 | 55                 | 60 | 65 | 70              | 75 |    |                  |    |
|                        | Farblose<br>Lösung | Farblose<br>Lösung | E  | E  | Farblose Lösung |    |    |                  |    |

Die Tabelle zeigt, daß auch in diesem Falle die Spaltung des Stärkemoleküls, sowie auch die umgekehrte Reaktion stattfindet, nur geht dieser Prozeß wegen der besonders energischen Wirkung der Diastase von *Ornithopus sativus* im Vergleich zu den anderen Samen so schnell vor sich, daß seine Feststellung schwerer gelingt.<sup>1)</sup> Zur Untersuchung der Frage, welche Zuckerarten durch die Wirkung der saccharifizierenden Fermente gebildet werden, wurden Versuche mit den Samen von *Ornithopus sativus*, *Vicia sativa*, *Trifolium repens* und *Trifolium hybridum* ausgeführt. Alle Samen keimten vor den Versuchen zwei Tage lang aus, außer den Roggensamen, welche in frischem Zustande untersucht wurden. Zur Charakterisierung der verschiedenen Zuckerarten wurden ihre Osazone dargestellt, bei welchen der Schmelzpunkt, die Löslichkeit in Alkohol, das Drehungsvermögen usw. bestimmt wurden.

Nachdem bei obigen Versuchen die Einwirkung der Enzyme auf Stärke beendet war, wurden 5 ccm abfiltriert und in einer Schale mit 15 ccm Wasser, 2 g salzsauren Phenylhydrazins und

<sup>1)</sup> Weitere Untersuchungen in der Richtung müssen uns darüber aufklären, mit welcher Art Erscheinung man in dem Falle zu rechnen hat, ob mit einem Retrogradationsprozeß nach Maquenne und Roux oder mit einer diast. Wirkung (z. B. Amylopektase und dergleichen). N. Sieber.

3 g Natriumacetat vermischt und auf dem Wasserbade bis zu dem Auftreten der Krystalle erwärmt.

Die in unseren Versuchen erhaltenen Osazone wurden aus Alkohol umkrystallisiert und nach dem Trocknen im Exsikkator bis zu konstantem Gewicht ihr Schmelzpunkt bestimmt. Es erwies sich, daß nach der Einwirkung der Samen von *Ornithopus sativus*, *Vicia sativa* und *Trifolium repens* auf eine 1%ige Lösung von Kartoffelstärke ein Osazon erhalten wird, das bei 195° C. schmilzt und dessen wässrige Lösung linksdrehend ist. Dem Schmelzpunkt nach steht diesem Osazon das Osazon der Galaktose am nächsten, welches bei 192°—193° C. schmilzt. Das Galaktosazon ist aber in Essigsäure löslich<sup>1)</sup> und ist optisch inaktiv.<sup>2)</sup> Bei der Einwirkung von *Trifolium hybridum* auf Stärkekleister wird aber ein Zucker gebildet, von welchem es mir trotz wiederholter Versuche nicht gelungen ist, ein krystallinisches Osazon zu erhalten. Ich erhielt immer nur eine amorphe Masse, deren Schmelzpunkt zwischen 155°—190° C. schwankte, so daß die Frage, welcher Zucker in diesem Falle gebildet wird, einstweilen offen bleibt.

Bei der Einwirkung der Roggensamen werden, wie die Untersuchung der Osazone gezeigt hat, zwei Zucker gebildet, die Laktose und die Glukose. Das nach der Einwirkung der Roggensamen erhaltene Osazon wurde mit kaltem 95%igen Alkohol gewaschen, wobei ein Teil des Osazons sich löste. Das in 95%igem Alkohol lösliche Osazon hatte nach dem Umkrystallisieren einen Schmelzpunkt = 200° C., wie bekanntlich auch das Laktosazon den gleichen Schmelzpunkt hat. Das in kaltem Alkohol unlösliche Osazon schmolz bei 200° C. und erwies sich als das gewöhnliche Glukosazon. Es löste sich leicht in heißem 95%igen Alkohol.

---

<sup>1)</sup> E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XVII, S. 580, und Bd. XX, S. 825.

<sup>2)</sup> E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXIII, S. 385.

<sup>3)</sup> B. Tollens Kohlenhydrat, Bd. I, S. 289.

---