

Über fermentative Ammoniakabspaltung in höheren Pflanzen.

Von
Alexander Kiesel.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium der Universität zu Moskau.)

(Der Redaktion zugegangen am 7. Juni 1909.)

Die sekundäre autolytische Ammoniakabspaltung ist in den letzten zehn Jahren schon öfters besprochen worden. Jacobi¹⁾ hatte zuerst gezeigt, daß bei der Autolyse der Leber sich Ammoniakmengen bilden, die nicht primären Ursprungs sein konnten, und somit auf eine sekundäre Ammoniakbildung hingewiesen.

Ganz besonders wurde die Tatsache der fermentativen sekundären Ammoniakabspaltung von Lang²⁾ für zerriebene tierische Organe und von Shibata³⁾ für das zerriebene Mycel oder Acetondauerpräparat von *Aspergillus niger* erwiesen, indem der erstere in verschiedenen Fällen die Desamidierung von Glykokoll, Leucin, Tyrosin, Cystin, Glukosamin, Asparagin, Glutamin, Acetamid, Harnstoff und Harnsäure,⁴⁾ also die Abspaltung wie des Amid- so auch des Aminostickstoffs, letzterer die Desamidierung von Harnstoff, Biuret, Acetamid, Oxamid, Hippursäure,⁵⁾ also die Abspaltung des Amidstickstoffs⁶⁾ beobachten konnten.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 147.

²⁾ Beitr. z. chem. Physiologie, herausg. von Hofmeister, Bd. V, 1904, S. 321.

³⁾ Ibid., S. 384.

⁴⁾ Jedoch nicht Phenylalanin.

⁵⁾ Dagegen nicht Urethan, Guanidin, Allantoin, Harnsäure, Benzamid; Asparagin wurde sehr schwach desamidiert.

⁶⁾ Eine kleine Menge Ammoniak wurde auch von Alanin und Tyrosin abgespalten, dagegen waren die Versuche mit Glykokoll, Leucin und Asparaginsäure erfolglos.

Aus den Arbeiten von Gulewitsch¹⁾ und Schwarzschild²⁾ mußte gefolgert werden, daß diese sekundäre Desamidierung nicht die Folge der Einwirkung eines proteolytischen Fermentes sein konnte, sondern einen besonderen fermentativen Prozeß als Grund hatte. Shibata wandte zur Bezeichnung des an dem Prozeß beteiligten Fermentes den Ausdruck «Amidase» an, den Pringsheim³⁾ nach der Wirkung des Fermentes mit dem Namen «Desamidase» ersetzt.

Eine Fortsetzung der Versuche von Shibata bildet die eben erwähnte³⁾ Arbeit von Pringsheim, der aber bei Acetondauerhefe sowie beim Preßsaft von *Allescheria Gayonii* keine desamidierende Wirkung erhalten konnte. Seine negativen Resultate erklärt Pringsheim mit dem Hinweis auf die Arbeit von Effront, der eine desamidierende Wirkung auf Amide und Aminosäuren⁴⁾ bei lebenden Hefezellen nachweisen konnte, damit, daß die Desamidase sehr empfindlich sei und wie durch Behandeln mit Aceton und Äther, so auch durch bloßes Auspressen des Saftes, in dem sie enthalten sein mußte, zerstört oder stark geschädigt würde.

Wenn wir uns zu den höheren Pflanzen wenden, so können wir aus der Arbeit von Butkewitsch mit anästhesierten Pflanzenkeimlingen⁵⁾ die Möglichkeit einer anomalen, gewöhnlich nicht vorkommenden Ammoniakanhäufung (bis 14,4 % des Gesamtstickstoffs) entnehmen. Dieselbe anomale Anhäufung wurde neuerdings auch von Butkewitsch⁶⁾ bei Hungerversuchen mit ca. 7 wöchentlichen Keimpflanzen gefunden (13,29 % des Gesamtstickstoffs). In beiden Fällen mußte die Ammoniak-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII.

²⁾ Hofmeisters Beitr., Bd. IV.

³⁾ Biochem. Zeitschrift, 1908, Bd. XII, S. 15.

⁴⁾ Compt. rend. de l'Acad. de sc., 1908, Bd. CXLVI, S. 779. Desamidierung von Leucin, Glutaminsäure und Asparagin (beide NH_2 -Gruppen). Schon früher wurde von Butkewitsch (Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. XXXVIII, 1903) und Emmerling (Zentralbl. f. Bakt. (2), Bd. X, Nr. 9, 1903) eine derartige Desamidierung durch lebende Schimmelpilze erwiesen.

⁵⁾ Tagebuch d. XI. Vers. russ. Naturf. u. Ärzte in St. Petersburg, 1902, S. 387; Biochem. Zeitschrift, Bd. XVI, 1909, S. 416.

⁶⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. XVI, S. 425.

bildung ihren Ursprung aus den primären Spaltungsprodukten des Eiweißes nehmen und wurde augenscheinlich statt des stets normal vorkommenden Asparagins (und anderer Amide) gebildet, das nach den jetzigen Anschauungen (E. Schulze, Butkewitsch, Zaleski u. a.) ein Speicherungsprodukt des zur Synthese des Eiweißes verwendbaren, aber in größeren Mengen der Pflanze schädlichen (O. Loew) Ammoniaks ist.

Eine autolytische Ammoniakabspaltung in Pflanzen wurde im Jahre 1907 von Castoro¹⁾ und von Zaleski²⁾ nachgewiesen. Beide Forscher gebrauchten zu ihren Versuchen Material, das bei gelinder Wärme getrocknet, und dann mit Wasser und einem Antiseptikum in den Thermostaten gebracht wurde. Zaleski beschreibt außerdem Versuche (Vers. 3 u. 4), in denen Preßsaft angewendet wurde. Da aber nur der Ammoniakstickstoff bestimmt wurde, konnte über den Ursprung des bei der Autolyse gebildeten Ammoniaks nichts ausgesagt werden, und man könnte ihn ganz der primären Eiweißspaltung zuschreiben.

Die früheren Autolyseversuche von Butkewitsch,³⁾ die mit jungen (meist 2—6tägigen), vor dem Versuche getrockneten und zerriebenen Keimpflanzen angestellt wurden, ergaben keine Desamidierung. Auf Grund dieser Ergebnisse will Butkewitsch in den höheren Pflanzen keine Desamidierung der Aminosäuren, die zugleich nicht mit Oxydation verbunden wäre, zulassen,⁴⁾ besonders da er bei einem Anästhesieversuche die Abhängigkeit der Ammoniakanhäufung von der Anwesenheit von Sauerstoff nachweisen konnte.⁵⁾ Bei den Autolyseversuchen schließt Butkewitsch die Beteiligung des Sauerstoffs aus⁶⁾ und meint, daß in den Bedingungen, welche bei den ent-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. L, S. 525.

²⁾ Ber. d. Deutsch. botan. Gesellsch., Bd. XXV, S. 357.

³⁾ W. Butkewitsch, Die regressive Metamorphose der Eiweißstoffe in höheren Pflanzen und die Beteiligung des proteolytischen Enzyms an diesem Vorgange, 1904, russ.; Biochem. Zeitschrift, Bd. XVI, 1909, S. 446.

⁴⁾ Biochem. Zeitschrift, *ibid.*, S. 452.

⁵⁾ Biochem. Zeitschrift, *ibid.*, S. 424.

⁶⁾ Biochem. Zeitschrift, *ibid.*, S. 451.

sprechenden Versuchen von Castoro und Zaleski herrschten, eine solche Desamidierung (d. h. eine autolytische Desamidierung der Aminosäuren) nicht stattfindet.¹⁾

Durch die letzte Arbeit von Butkewitsch veranlaßt, will ich eine vor einiger Zeit von mir gemachte Untersuchung bekanntmachen, in der gerade die Desamidierung, die Butkewitsch den höheren Pflanzen abspricht, stattgefunden hat.

In der Meinung, daß die Desamidierung, als sekundärer Prozeß, bei älteren Keimpflanzen stärker ausgesprochen sein müsse, als bei jüngeren, wo sie durch die primären Prozesse stark verdeckt und zurückgedrängt wird, verwendete ich zu dem Autolyseversuche im Gegensatz zu Butkewitsch und Castoro ca. 23—24 tägige, bei sehr schwachem Lichte aufgezogene Keimpflanzen von *Vicia Faba*, die, wenn auch ergrünt, doch den Habitus etiolierter Pflanzen hatten.

Da es möglich war, daß das desamidierende Ferment stark empfindlich ist und leicht seine Wirksamkeit verliert, so wollte ich das für die quantitativen Bestimmungen nötige Trocknen umgehen und wendete deshalb nur den unter starkem Drucke von dem mit einer Fleischhackmaschine zerkleinerten und dann mit möglichst wenig Sand zerriebenen Materiale abgepreßten Saft an, von dem zu jeder Bestimmung mit einer trockenen Pipette nach starkem Umrühren eine gewisse Menge genommen und abgewogen wurde. Die Notwendigkeit des Umrührens war bedingt durch den gebildeten feinflockigen, wenn auch nicht großen, Niederschlag. Schon während der Bereitung färbte sich der Saft tief violett-schwarz.

Die zur Selbstverdauung bestimmte Saftmenge wurde in einen Thermostaten bei 37° unter Chloroform- und Toluolzusatz gestellt und verblieb dort 25 Tage.²⁾ Die Kontrollportion wurde sogleich zu den verschiedenen Bestimmungen genommen.

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, *ibid.*, S. 449.

²⁾ Die Zeit war möglicherweise unnötig lang gewesen. Weitere Versuche müssen uns zeigen, welche Zeit zur merklichen Desamidierung nötig ist.

Vor jeder Bestimmung wurden die fermentativen Prozesse durch 5 Minuten dauerndes Erwärmen im kochenden Wasserbade abgeschlossen. Zur Stickstoffbestimmung bediente ich mich der Kjeldahlschen Methode; beim Bestimmen des Eiweißstickstoffs benutzte ich die Fällung des Eiweißes nach Stutzer. Der Pepton- und Basenstickstoff wurde im Filtrate nach der Eiweißfällung bestimmt. Der Ammoniakgehalt wurde durch Abdestillieren mit Magnesia unter vermindertem Drucke bei 40°, der Amidstickstoff nach Sachsse bestimmt, wobei beim Abdestillieren des Ammoniaks durch den Destillationskolben Luft durchgeblasen wurde.

	Kontrollportion		Autolyseversuch		Differenz in % N
	In 100 g Saft in g	% des Ge- samt-N	In 100 g Saft in g	% des Ge- samt-N	
Gesamtstickstoff	0,543	100	0,551	100	—
Eiweißstickstoff	0,112	20,63	0,101	18,33	— 2,30
Basen- und Peptonstickstoff	0,030	5,52	0,055	9,98	+ 4,46
Ammoniakstickstoff	0,013	2,40	0,075	13,61	+ 11,21
Amidstickstoff	0,121	22,29	0,104	18,87	— 3,42
N in anderen Verbindungen . (haupts. Aminostickstoff)	0,267	49,17	0,216	39,20	— 9,97

Aus den eben angeführten Zahlen ist zu ersehen, daß bei der Autolyse starke Ammoniakbildung stattgefunden hat, die bei langem nicht durch den primären Zerfall der Eiweißstoffe, der hier sehr gering ausfiel (— 2,30%) und die Abspaltung des Amidstickstoffs (— 3,42%), die auch durch die möglicherweise bei der Autolyse gebildeten Säuren stattfinden konnte, gedeckt wurde. Das Ammoniak müßte noch eine andere Quelle haben und es wäre dabei zuallererst an die Amino-Gruppe der Aminosäuren zu denken, da doch wohl der Stickstoff der unbestimmten Substanzen zum allergrößten Teil eben diesen Verbindungen angehören mußte.

Somit wäre also eine autolytische sekundäre Desamidierung der Aminosäuren in höheren Pflanzen nachgewiesen oder doch sehr wahrscheinlich gemacht und ich muß mich der Meinung von Pringsheim anschließen, der die leichte Zerstörbarkeit der desamidierenden Fermente voraussetzt. Die autolytischen Versuche von Butkewitsch, in denen keine Desamidierung stattgefunden hat, könnte man vielleicht durch das Abtöten der desamidierenden Fermente beim Trocknen erklären. Es wäre aber, wie gesagt, auch möglich, daß in dem Alter, welches die Keimpflanzen bei Butkewitschs Versuchen hatten, die sekundären Desamidierungsprozesse stark zurücktreten mußten und deshalb nicht nachgewiesen werden konnten. Letzteres gewinnt an Wahrscheinlichkeit durch den von Butkewitsch zuletzt gemachten Hungerversuch,¹⁾ wo 7-wöchentliche Keimpflanzen starke Ammoniakanhäufung aufwiesen.

Die Frage, ob nicht bei dem im eben beschriebenen Versuche stattgehabten fermentativen Desamidationsprozesse den Oxydationsvorgängen, die Butkewitsch für nötig hält, doch eine gewisse Rolle zugeschrieben werden muß, muß noch unbeantwortet bleiben. Zur Lösung dieser Frage müssen noch spezielle Versuche angestellt werden.

Analytische Belege.

Außer den Ammoniak- und Amidstickstoffbestimmungen, wo 0,5-n-Schwefelsäure vorgelegt, wurde bei den anderen Bestimmungen das Ammoniak in 0,5-n-Salzsäure aufgefangen. Die zum Titrieren benutzte Natronlauge entsprach: 1 ccm NaOH-Lösung = 0,001702 g Stickstoff.

(Siehe Tabelle auf folgender Seite.)

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, *ibid.*, S. 425.

	Saft- menge in g	NaOH ent- sprechend dem NH ₃ in ccm	Stickstoff gefunden			
			in g	auf 100 g Saft berechnet in g	do. Mittel in g	in % des N
Kontrollportion						
Gesamtstickstoff	4,4933 4,5230	14,18 14,61	0,02413 0,02486	0,537 0,549	0,543	100
Eiweißstickstoff	20,5553 20,7102	13,20 14,05	0,02246 0,02391	0,109 0,115	0,112	20,63
Stickstoff im Phosphorwolfram- säureniederschlage	20,5553 20,7102	4,96 5,57	0,00844 0,00948	0,041 0,046	0,043	7,92
Ammoniakstickstoff	30,2546 25,4885 31,7413	2,79 1,53 2,68	0,00475 0,00260 0,00456	0,016 0,010 0,014	0,013	2,40
Amid- + Ammoniak- stickstoff	20,0288 20,2679	15,47 16,22	0,02633 0,02760	0,131 0,136	0,134	24,68
Amidstickstoff	—	—	—	—	0,121	22,29
Basen- und Pepton- stickstoff	—	—	—	—	0,030	5,52
N in anderen Verbin- dungen (inkl. Amino- stickstoff der Amide)	—	—	—	—	0,267	49,17
Autolyseversuch						
Gesamtstickstoff	6,2738 5,1798	20,40 16,71	0,03472 0,02844	0,553 0,549	0,551	100
Eiweißstickstoff	18,9777 18,1637	11,29 10,86	0,01921 0,01848	0,101 0,102	0,101	18,33
Stickstoff im Phosphorwolfram- säureniederschlage	18,9777 18,1637	14,35 14,01	0,02442 0,02384	0,129 0,131	0,130	23,59
Ammoniakstickstoff	18,8467 22,8868	9,15 9,71	0,01557 0,01653	0,077 0,072	0,075	13,61
Amid- + Ammoniak- stickstoff	22,2677 18,7120	22,69 20,27	0,03862 0,03450	0,173 0,184	0,179	32,47
Amidstickstoff	—	—	—	—	0,104	18,87
Basen- und Pepton- stickstoff	—	—	—	—	0,055	9,98
N in anderen Verbin- dungen (inkl. Amino- stickstoff der Amide)	—	—	—	—	0,216	39,20