

Über das Verhalten des Asparagins bei Autolyse von Pflanzen.

Von
Alexander Kiesel.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium der Universität zu Moskau.)
(Der Redaktion zugegangen am 9. Juni 1909.)

Das Asparagin wird in jetziger Zeit wohl allgemein als ein sekundäres Produkt in Pflanzen angesehen. Daß es sich nicht bei tryptischer Verdauung bildet, wurde durch Versuche von Butkewitsch¹⁾ gezeigt, der nach der Autolyse nahezu die anfänglichen Asparaginsmengen wiederfand.

Der Meinung einiger Autoren (O. Loew) entgegen kann wohl kaum eine direkte Eiweißbildung aus dem Asparaginmolekül angenommen werden und man wird veranlaßt, einen als Zwischenstadium notwendigen Zerfall des Asparagins anzunehmen, welcher wohl zuerst in einer Abspaltung von Ammoniak²⁾ besteht, das dann an dem Aufbau des Eiweißmoleküls teilnimmt.

Es wäre demnach sehr wünschenswert, eine destruktive Verarbeitung des Asparagins nachzuweisen und da diese wohl als fermentativ zu erwarten ist, so wäre es dabei nötig, einen sie hervorrufenden fermentativen Prozeß zu entdecken.

Ein derartiger Prozeß für tierische Organe (Leberbrei) wurde von S. Lang³⁾ nachgewiesen. Der genannte Forscher fand eine fermentative Ammoniakabspaltung vom Asparaginmolekül. Welche Produkte neben dem Ammoniak entstanden

¹⁾ Die regress. Metamorph. d. Eiw. in höh. Pflanzen usw., 1904. Russ.

²⁾ E. Schulze, Landw. Jahrb., Bd. VII (1878), S. 411; Bd. XXXV (1906), S. 645; Butkewitsch, Bioch. Zeitschr., Bd. XVI (1909), S. 437.

³⁾ Beiträge z. chem. Physiologie, herausg. von Hofmeister, Bd. V (1904), S. 321.

waren, wurde nicht nachgewiesen. Ein Versuch von Shibata,¹⁾ die fermentative Desamidierung von Asparagin durch ein Aceton-dauerpräparat von *Aspergillus niger* hervorzurufen, schlug fehl, obgleich dasselbe Präparat die Desamidierung verschiedener anderer Amide bewirkte, und Shibata konnte nur eine sehr schwache Ammoniakabspaltung in dem von ihm untersuchten Falle nachweisen.

Bei höheren Pflanzen, wo das Asparagin eine höchst wichtige Rolle spielt, wurde der fermentative Asparaginabbau, soweit mir bekannt, noch nicht untersucht, jedenfalls noch nicht gefunden, obgleich es doch, wie gesagt, sehr wahrscheinlich ist, daß das Asparagin in höheren Pflanzen abgebaut wird.

In meinen Versuchen hatte ich die Absicht, diese Lücke unserer Kenntnisse zu füllen, und kam zu dem von mir erwarteten Resultate. Dabei wurden aber die aus dem Asparagin hervorgegangenen Spaltungsprodukte nicht untersucht — ich habe die Hoffnung dieses in nächster Zeit tun zu können —, ich beschränkte mich mit dem einfachen Nachweis der fermentativen (autolytischen) Verarbeitung oder des Verbrauchs des Asparagins bei der Autolyse von höheren Pflanzen.

Die Fermentbildung muß den Bedürfnissen des Organismus angepaßt sein und deshalb wollte ich, um einen möglichst klaren und deutlichen Prozeß vor Augen zu haben, das asparaginspaltende Enzym in einem Stadium suchen, in dem es wohl in der besten Weise seine Wirkung entfalten könnte, d. h. in einem Stadium, wo eine größere Asparaginmenge in Pflanzen vorhanden ist.

Es wurden daher zu den autolytischen Versuchen nicht junge Keimpflanzen, sondern solche, die ein Alter von etwa 3—4 Wochen hatten, genommen. Dennoch hatte ein Versuch (Vers. I) mit *Vicia Faba* nicht den erwarteten Erfolg gehabt und es könnte vielleicht auch sein, daß der autolytische Asparaginzerfall, um stattzufinden, besondere Bedingungen erfordert, z. B. die Abwesenheit gewisser hindernder Substanzen, oder daß das Ferment eine lokale Verbreitung hat, da gerade im

¹⁾ Beitr. z. chem. Physiologie, Bd. V (1904), S. 384.

I. Versuch die Samenlappen entfernt wurden, was in den anderen nicht der Fall war; letzteres scheint nicht sehr wahrscheinlich, da doch das asparaginspaltende Ferment eher in den Axenorganen, als in den Samenlappen zu erwarten ist. Diese Fragen müssen noch im weiteren näher untersucht werden.

I. Versuch.

29 tägige Keimpflanzen von *Vicia Faba* wurden von ihren Samenlappen befreit, zerkleinert und mit einer Handpresse möglichst stark abgepreßt. Der erhaltene Saft (1130 ccm) wurde in 2 gleiche Portionen geteilt, die eine sogleich, die andere nach 23 tägigem Stehen im Thermostaten unter Chloroform- und Toluolzusatz verarbeitet, wobei die Fällung mit Quecksilberoxydnitrat angewandt wurde. In beiden Portionen wurden die ziemlich gleichen Asparaginsmengen erhalten:

I. Kontrollportion 5,7 g

II. Autolyseportion 5,9 g

Das Asparagin wurde durch Krystallwasserbestimmung und die Kupferverbindung identifiziert. In der zweiten Portion war eine deutliche Tyrosinbeimengung in Form von dunklen Sphäriten, die sehr schön die Millonsche Reaktion gaben, vorhanden.

II. Versuch.

23—24 tägige, bei sehr schwachem Lichte aufgezogene Keimpflanzen von *Lupinus albus* wurden zerkleinert, abgepreßt und der erhaltene Saft (2200 ccm) in 2 gleiche Teile geteilt, von denen der eine sogleich, der andere nach einmonatlichem Verweilen im Thermostaten bei 38° auf Asparagin untersucht wurden. Als Antiseptikum wurde Chloroform + Toluol benutzt. Das Asparagin wurde nach der üblichen Methode mit Quecksilberoxydnitrat gefällt. Dieser Versuch ergab ein völliges Verschwinden des Asparagins während der Autolyse: in der Autolyseportion konnte keine für das Asparagin charakteristische krystallinische Ausscheidung erhalten werden, wogegen aus der Kontrollportion 12,27 g Asparagin in großen Krystallen erhalten wurde. Zur Identifikation wurde die Kupferverbindung dargestellt.

III. Versuch.

In diesem Versuche wurde nicht der Saft, sondern einerseits das zerriebene Pflanzenmaterial, andererseits durch Kälte getötete unzerriebene Pflanzen der Autolyse überlassen. Als Material dienten, wie im vorigen Versuch, Keimpflanzen von *Lupinus albus*, die aber völlig etioliert waren und ein Alter von 34 Tagen hatten. Eine weitere Abänderung bestand darin, daß die Kontrollportion nicht sogleich untersucht wurde, sondern nach der Abtötung der Fermente unter Chloroform und Toluolzusatz die gleiche Zeit mit den Autolyseportionen stehen gelassen wurde.

Da ich durch äußere Umstände verhindert war, die Verarbeitung in baldiger Zeit vorzunehmen, so wurden die verschiedenen Portionen nicht in einen Thermostaten gebracht, sondern blieben bei gewöhnlicher Zimmertemperatur gegen 4 Monate stehen.

Die Menge des in jeder Portion enthaltenen Materials war 400 g (Frischgewicht). Die Asparaginausscheidung wurde nach Aufkochen zum Entfernen der Eiweißstoffe direkt durch Einengen, ohne die Quecksilberoxydnitratfällung zu benutzen, vollzogen. Die ausgeschiedenen Asparaginemengen waren die folgenden:

I. Kontrollportion 7,60 g

II. Durch Kälte abgetötete Pflanzen a) 4,11 g

b) 4,28 g

III. Pflanzenbrei: Keine Ausscheidung von Asparagin.

In jeder Portion wurde das ausgeschiedene Asparagin durch Krystallwasserbestimmung und Überführen in die Kupferverbindung identifiziert.

In den Mutterlaugen von IIa, IIb und III bildete sich beim Stehenlassen eine Kruste, die das Aussehen von unreinen Leucinausscheidungen hatte. In der Kontrollportion fehlte diese Ausscheidung gänzlich und konnte sogar bei fast 2 monatlichem Stehen nicht erhalten werden.

Die gefundenen Resultate lassen erkennen, daß bei der Autolyse ein Asparaginzerfall stattgefunden hat, der aber in dem unzerrieben gebliebenen Material viel schwächer war. Das

läßt sich damit deuten, daß das asparaginspaltende Ferment zum größten Teil oder auch garnicht aus den Zellen herausdiffundiert war, und daß das im ausgetretenen Saft vorhandene Asparagin demnach seiner Wirkung entgangen war. Zugleich könnte dieses verschiedene Verhalten beim zerriebenen und bei dem unzerriebenen, durch Kälte abgetöteten Materiale ein guter Beweis für eine fermentative Spaltung des Asparagins sein und die Beteiligung von etwa gebildeten Säuren bei dem Prozesse ausschließen.

Daß bei dem Erfrieren eine Schwächung des Fermentes eingetreten war, ist kaum auf Grund der bisherigen Erfahrungen anzunehmen.

IV. Versuch.

Dieser Versuch hatte den Zweck, das asparaginspaltende Ferment durch Fällung mit Alkohol aus Pflanzen darzustellen.

Das Material (etiolierte $2\frac{1}{2}$ wöchentliche Keimlinge von *Lupinus albus*) wurde zerkleinert und ausgepreßt. Der Saft wurde dann mit einem doppelten Volumen 97%igen Alkohols vermischt und über Nacht stehen gelassen. Der erhaltene zum Teil sehr flockige Niederschlag, der auch noch viel von auskrystallisiertem Asparagin enthielt, das zum größten Teil in Form von großen Krystallen abgetrennt wurde, wurde auf einem Filter gesammelt (nach Abgießen der überstehenden Flüssigkeit) und mit Wasser von 40° ausgewaschen, das Waschwasser wieder mit Alkohol versetzt und die verschiedenen Niederschläge vereinigt, mit Alkohol und Äther ausgewaschen und über Schwefelsäure getrocknet. Der Niederschlag, der wohl zum größten Teil aus niedergeschlagenem Eiweiß bestand und wohl noch ein wenig Asparagin einschloß, hatte ein pulveriges Aussehen und eine etwas graue Farbe.

Um zu entscheiden, ob der Niederschlag asparaginspaltende Eigenschaften hatte, wurde je 1 g Asparagin mit 0,15 g des Niederschlags in 30 ccm Wasser in 2 Kölbchen gebracht, das eine davon 3 Minuten lang im kochenden Wasserbade gehalten und dann beide in einen Thermostaten gebracht, wo sie dann nach Chloroform- und Toluolzusatz 27 Tage verweilten.

Die Resultate waren die folgenden:

	Versuchsprobe:	Kontrollprobe:
«Fermentmenge»	0,1505	0,1504
Asparagin zugesetzt	1,001	1,001
» ausgeschieden	0,957	0,955

Es konnte also keine asparaginspaltende Wirkung in dem durch Alkoholzusatz erhaltenen Niederschlage nachgewiesen werden. Welche Erklärung man diesem Resultate geben kann, ist noch nicht zu entscheiden. Es wäre vielleicht an eine leichte Zerstörbarkeit des Fermentes zu denken.
