

Über den Gehalt ungekeimter und gekeimter Samen verschiedener Pflanzenarten an peptolytischen Fermenten.

Von

Emil Abderhalden und Dammhahn.

(Aus dem physiologischen Institute der tierärztlichen Hochschule, Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 26. August 1908.)

Durch zahlreiche Untersuchungen, vor allem von E. Schulze und E. Winterstein, sind wir über die beim Übergang des Ruhestadiums von Pflanzensamen in den Zustand der Keimung vor sich gehenden Stoffwechselprozesse recht gut unterrichtet. Es gilt dies in erster Linie für den Ab- und Umbau der in den Samen befindlichen Reserveeiweißstoffe. Sie werden unzweifelhaft in weitgehender Weise abgebaut. Es treten Aminosäuren auf. Aus ihnen baut offenbar der werdende Keimling seine eigenen Proteine nach seinen Bedürfnissen wieder auf. Bei all diesen Prozessen sind Fermente tätig. Es interessierte uns, festzustellen, ob auch peptolytische, d. h. auf Polypeptide eingestellte Fermente vorhanden sind. Diese Frage hat der eine von uns in Gemeinschaft mit Schittenhelm¹⁾ bejaht. Die unten angeführten Versuche bestätigen den Befund von peptolytischen Fermenten in keimenden Samen. Im ruhenden Stadium lassen sie sich hingegen nicht nachweisen. Manche Beobachtungen sprechen dafür, daß sie trotzdem bereits vorhanden sind, jedoch höchstwahrscheinlich in einem inaktiven Vorstadium. Wiederholt wurde festgestellt, daß der aus ungekeimten Samen bereitete Preßsaft zunächst unwirksam war und erst nach längerem Stehen bei 37° wirksam wurde.

Wir haben in allen Fällen Parallelversuche ausgeführt und zwar mit ungekeimten und gekeimten Samen. Vor ihrer Ver-

¹⁾ Emil Abderhalden und Alfred Schittenhelm, Die Wirkung der proteolytischen Fermente keimender Samen des Weizens und der Lupinen. Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 26, 1906.

wendung wuschen wir die Samen mit 4%iger Borsäurelösung. Dann zerrieben wir sie mit Quarzsand zu einem feinen Brei und vermengten ihn dann mit soviel Kieselgur, bis das Ganze eine plastische Masse bildete. Sie wurde nun in festes Kolier-
tuch eingepackt und zunächst bei 150 Atmosphären Druck ausgepreßt. Eine weitere Fraktion an Preßsaft gewannen wir unter Anwendung von 150—300 Atmosphären Druck. Wir verwendeten zu den unten mitgeteilten Versuchen nur die letztere Fraktion.

Die Versuche selbst haben wir in der Weise durchgeführt, daß wir den Preßsaft zu einer bestimmten Menge Glycyl-l-tyrosin zufügten. Entweder isolierten wir in der oft an dieser Stelle geschilderten Weise die Spaltprodukte resp. das unveränderte Glycyl-l-tyrosin, oder wir verfolgten den Gang der Fermenthydrolyse durch Beobachtung des Drehungsvermögens der Lösung. Die Durchführung der Versuche war mit großen Schwierigkeiten verknüpft. Bald waren die Preßsäfte zur Polarisierung zu dunkel gefärbt, bald trat nach kurzer Zeit Trübung ein, bald zeigte sich auch nachträglich Dunkelfärbung. Die tyrosinhaltigen Polypeptide sind zu Untersuchungen von Fermentlösungen aus Pflanzen nicht geeignet, weil bei diesen offenbar Fermente, die Tyrosin oxydieren, außerordentlich verbreitet sind. Wir konnten wiederholt das zugesetzte Glycyl-l-tyrosin nicht mehr auffinden, jedoch auch keine Spaltprodukte isolieren. Aus der großen Zahl von Versuchen sind nur die unten mitgeteilten ganz einwandfrei. Die Resultate waren einheitlich. Wir haben natürlich stets Kontrollversuche mit den Preßsäften allein durchgeführt, um uns vor Täuschungen zu schützen.

Experimenteller Teil.

1. Versuche mit Lupinensamen.

a) Ungekeimt.

1. 1 g Glycyl-l-tyrosin in 25 ccm Wasser gelöst und nach Zusatz von 5 ccm Preßsaft und etwas Toluol 4 Tage bei Zimmertemperatur (ca. 25°) aufbewahrt. Die Lösung blieb klar. Sie wurde nun aufgekocht, filtriert und eingeengt. Es erfolgte keine Abscheidung von Tyrosin. Auch Glykokoll konnte nicht nachgewiesen werden, dagegen ließ sich das unveränderte Glycyl-

l-tyrosin in Form seines Anhydrids fast quantitativ wieder gewinnen.

2. 1 g Glycyl-glycin in 10 ccm Preßsaft gelöst, und die Lösung nach Zusatz von Toluol bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Dauer des Versuches 4 Tage. Isoliert 1,15 g Glycyl-glycinesterchlorhydrat (F. = 182,5° [korr.]) und Spuren von Glykokollesterchlorhydrat (unwägbar Mengen).

3. 1 g Glycyl-l-tyrosin + 25 ccm Preßsaft + Toluol. Dauer des Versuches 4 Tage. Isoliert Spuren von Glykokollesterchlorhydrat und 0,88 g Glycyl-l-tyrosinesterchlorhydrat. (F. unter Zersetzung gegen 240°).

4. 1 g Glycyl-l-tyrosin + 25 ccm Preßsaft + Toluol. Dauer des Versuches 4 Tage. Die Lösung wurde bei 37° aufbewahrt. Isoliert 0,05 g l-Tyrosin, 0,65 g Glycyl-l-tyrosinesterchlorhydrat und 0,10 g Glykokollesterchlorhydrat.

b) Gekeimt.

1. 1 g Glycyl-l-tyrosin + 25 ccm Preßsaft + Toluol. Bei Zimmertemperatur 4 Tage aufbewahrt. Schon am zweiten Tage schieden sich Körnchen von Tyrosin ab. Die ausgeschiedenen Krystalle wurden abfiltriert und aus Wasser unter Anwendung von Tierkohle umkrystallisiert. Die Menge des reinen Tyrosins betrug 0,31 g. An Glykokollesterchlorhydrat wurden 0,25 g erhalten, ferner 0,22 g Glycyl-l-tyrosinanhydrid.

2. 1 g Glycyl-l-tyrosin + 25 ccm Preßsaft + Toluol. Die Lösung wurde 3 Tage bei 37° aufbewahrt. Es erfolgte reichliche Abscheidung von Tyrosin. Seine Menge betrug 0,42 g. Ferner wurden 0,35 g Glykokollesterchlorhydrat (F. 144° [korr.]) erhalten.

3. 1 g Glycyl-glycin + 15 ccm Preßsaft + Toluol. Nach dreitägigem Stehen bei 37° verarbeitet. Isoliert 0,68 g Glykokollesterchlorhydrat.

2. Versuche mit Weizensamen.

I. Direkte Isolierung der Spaltprodukte.

a) Ungekeimt.

1. 1 g Glycyl-l-tyrosin + 25 ccm Preßsaft + Toluol. Der Versuch wurde nach viertägigem Stehen bei 37° abgebrochen.

Es war keine Spaltung nachweisbar. Fast das gesamte Dipeptid wurde zurückgewonnen.

2. 1 g Glycyl-l-tyrosin + 25 ccm Preßsaft + Toluol. Die Lösung blieb 4 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Auch hier war eine Hydrolyse nicht nachweisbar.

b) Gekeimt.

1. 1 g Glycyl-l-tyrosin + 25 ccm Preßsaft + Toluol. Schon am ersten Tage begann die Lösung sich zu trüben und am 4. Tage waren 0,25 g l-Tyrosin abgespalten. Der Versuch war bei 37° durchgeführt worden. An Glykokollesterchlorhydrat erhielten wir 0,18 g, ferner wurden 0,48 g Glycyl-l-tyrosinanhidrid isoliert.

2. 1 g Glycyl-l-tyrosin + 25 ccm Preßsaft + Toluol. Die Lösung wurde 4 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Iso- liert 0,18 g l-Tyrosin, 0,15 g Glykokollesterchlorhydrat und 0,60 g Glycyl-l-tyrosinanhidrid.

3. 1 g Glycyl-glycin + 15 ccm Preßsaft + Toluol. Brut- raum. Isoliert 0,58 g Glycyl-glycinesterchlorhydrat und 0,42 g Glykokollesterchlorhydrat.

II. Feststellung der Hydrolyse durch Verfolgung des Drehungs- vermögens.

Kontrollversuch.		Versuch mit Preßsaft von ungekeimten Samen.	
	1,0 ccm Preßsaft.		1,0 ccm Preßsaft.
	5,5 » Wasser.		4,5 » Wasser.
			1,0 » Glycyl-l-tyrosinlösung (= 1/500-Mol.).
Zeit	Abgelesener Winkel		Abgelesener Winkel
0 Minuten	+ 0,15°		+ 1,75°
30 »	+ 0,15°		+ 1,70°
60 »	+ 0,16°		+ 1,58°
90 »	+ 0,14°		+ 1,52°
120 »	+ 0,12°		+ 1,50°
2 1/2 Stunden	+ 0,12°		+ 1,52°
3 »	+ 0,10°		+ 1,58°
4 »	+ 0,10°		+ 0,50°
6 »	+ 0,08°		+ 0,50°
12 »	+ 0,08°		+ 0,50°

Kontrollversuch.		Versuch mit Preßsaft von gekeimten Samen.	
1,0 ccm Preßsaft.		1,0 ccm Preßsaft.	
5,5 » Wasser.		4,5 » Wasser.	
		1,0 » Glycyl-l-tyrosinlösung (= $\frac{1}{500}$ -Mol.).	
Zeit	Abgelesener Winkel	Abgelesener Winkel	
0 Minuten	+ 0,68°	+ 2,30°	
30 »	+ 0,67°	+ 2,15°	
60 »	+ 0,66°	+ 2,01°	
1½ Stunden	+ 0,65°	+ 1,98°	
2 »	+ 0,62°	+ 1,75°	
4 »	+ 0,64°	+ 1,55°	
6 »	+ 0,60°	+ 1,55°	
12 »	+ 0,59°	+ 1,50°	
16 »	+ 0,60°	+ 1,40°	
24 »	+ 0,60°	+ 1,02°	

3. Versuche mit Maiskörnern.

I. Direkte Bestimmung der Spaltprodukte.

1. Ungekeimte Maiskörner.

1. 1 g Glycyl-l-tyrosin + 25 ccm Preßsaft + Toluol. Die Lösung wurde 4 Tage im Brutraum aufbewahrt. Sie blieb ganz klar. Weder Tyrosin noch Glykokoll waren nachweisbar. Eine Spaltung war nicht eingetreten.

2. 1 g Glycyl-l-tyrosin + 25 ccm Preßsaft + Toluol. 4 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Keine Hydrolyse erfolgt. Das Dipeptid konnte als Anhydrid fast quantitativ wieder gewonnen werden.

2. Gekeimte Maiskörner.

1. 1 g Glycyl-l-tyrosin + 25 ccm Preßsaft + Toluol. Nach 4tägigem Stehen bei 37° konnten 0,25 g l-Tyrosin und 0,18 g Glykokollesterchlorhydrat isoliert werden.

2. 1 g Glycyl-l-tyrosin + 25 ccm Preßsaft + Toluol. Die Lösung wurde 4 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Isoliert 0,15 g l-Tyrosin und 0,10 g Glykokollesterchlorhydrat.

II. Feststellung der Hydrolyse durch Verfolgung des Drehungsvermögens.
Kontrollversuch.

 1,0 ccm Preßsaft.
 5,5 » Wasser.

Versuch mit
ungekeimten Körnern.

 1,0 ccm Preßsaft.
 4,5 » Wasser.
 1,0 » Glycyl-l-tyrosinlösung
 (= $\frac{1}{500}$ -Mol.).

Zeit	Abgelesener Winkel	Abgelesener Winkel
0 Minuten	+ 0,18°	+ 1,80°
30 »	+ 0,16°	+ 1,76°
60 »	+ 0,17°	+ 1,76°
1½ Stunden	+ 0,16°	+ 1,77°
3 »	+ 0,12°	+ 1,76°
6 »	+ 0,12°	+ 1,75°
9 »	+ 0,12°	+ 1,74°
16 »	+ 0,10°	+ 1,75°
24 »	+ 0,10°	+ 1,75°
30 »	—	—

Kontrollversuch.

 1,0 ccm Preßsaft.
 5,5 » Wasser.

Versuch mit
gekeimten Körnern.

 1,0 ccm Preßsaft.
 4,5 » Wasser.
 1,0 » Glycyl-l-tyrosinlösung
 ($\frac{1}{500}$ -Mol.).

Zeit	Abgelesener Winkel	Abgelesener Winkel
0 Minuten	+ 0,40°	+ 2,15°
30 »	+ 0,39°	+ 2,10°
60 »	+ 0,39°	+ 2,0°
1½ Stunden	+ 0,32°	+ 1,96°
3 »	+ 0,30°	+ 1,75°
6 »	+ 0,30°	+ 1,75°
8 »	+ 0,25°	+ 1,50°
16 »	+ 0,25°	+ 1,42°
24 »	+ 0,25°	+ 1,36°
30 »	+ 0,25°	+ 1,30°

4. Versuche mit Gerstensamen.
I. Bestimmung der Spaltprodukte.
a) Ungekeimte Samen.

1. 1 g Glycyl-l-tyrosin + 25 ccm Preßsaft + Toluol.
 Dauer des Versuches 4 Tage. Bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Isoliert 0,05 g l-Tyrosin und Spuren von Glykokoll.

2. 1 g Glycyl-l-tyrosin + 25 ccm Preßsaft + Toluol.

Die Lösung wurde 4 Tage bei 37° stehen gelassen. Isoliert 0,10 g l-Tyrosin und 0,05 g Glykokollchlorhydrat (F. 144° [korr.]). 0,70 g Glycyl-l-tyrosinanhydrid wurden zurückgewonnen.

b) Gekeimte Samen.

1. Glycyl-l-tyrosin + 25 ccm Preßsaft + Toluol. Dauer des Versuches 4 Tage. Nach 4tägigem Stehen bei Zimmertemperatur wurden erhalten 0,25 g l-Tyrosin und 0,20 g Glykokollesterchlorhydrat.

2. Glycyl-l-tyrosin + 25 ccm Preßsaft + Toluol. Der Versuch dauerte 4 Tage und wurde bei 37° durchgeführt. Isoliert 0,38 g l-Tyrosin und 0,28 g Glykokollesterchlorhydrat.

II. Feststellung der Hydrolyse durch Verfolgung des Drehungsvermögens.

Kontrollversuch.

1,0 ccm Preßsaft.
5,5 » Wasser.

Versuch mit ungekeimtem Samen.

1,0 ccm Preßsaft.
4,5 » Wasser.
1,0 » Glycyl-l-tyrosinlösung (1/1000-Mol.).

Zeit	Abgelesener Winkel	Abgelesener Winkel
0 Minuten	+ 0,20°	+ 1,60°
30 »	+ 0,19°	+ 1,59°
60 »	+ 0,18°	+ 1,60°
2 Stunden	+ 0,18°	+ 1,58°
4 »	+ 0,17°	+ 1,45°
6 »	+ 0,16°	+ 1,44°
8 »	+ 0,17°	+ 1,40°
16 »	+ 0,16°	+ 1,41°
24 »	+ 0,16°	+ 1,40°

Kontrollversuch.

1,0 ccm Preßsaft.
5,5 » Wasser.

Versuch mit gekeimter Gerste.

1,0 ccm Preßsaft.
4,5 » Wasser.
1,0 » Glycyl-l-tyrosinlösung (1/1000-Mol.).

Zeit	Abgelesener Winkel	Abgelesener Winkel
0 Minuten	+ 1,50°	+ 3,15°
30 »	+ 1,45°	+ 3,00°
60 »	+ 1,40°	+ 2,90°
2 Stunden	+ 1,40°	+ 2,75°
4 »	+ 1,35°	Die Lösung trübte sich.

Die Lösung trübte sich.