

Studien über die Proteinbildung in reifenden Pflanzensamen.

II. Mitteilung.

Von

E. Schulze.

(Aus dem agrikulturchem. Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaktion zugegangen am 4. Januar 1911.)

Die Proteinsynthese in reifenden Pflanzensamen ist der Gegenstand einer Abhandlung, die ich in Verbindung mit E. Winterstein vor kurzem in dieser Zeitschrift¹⁾ veröffentlicht habe. Im folgenden teile ich einige bei Fortsetzung der Untersuchung erhaltene Ergebnisse mit, die zur Bestätigung und zur Ergänzung der in jener Abhandlung ausgesprochenen Schlußfolgerungen dienen können.

Wie in der ersten Mitteilung dargelegt worden ist, enthalten bei *Pisum sativum* die während des Reifens der Samen als Reservestoffbehälter dienenden Samenhülsen ein Gemenge nichtproteinartiger Stickstoffverbindungen, welches in seiner qualitativen und quantitativen Zusammensetzung von dem in den unreifen Samen sich findenden Gemenge gleicher Art in mehreren Punkten bedeutend abweicht. So ist z. B. der Gehalt der Hülsen an Asparagin so beträchtlich, daß dieses Amid leicht zur Abscheidung zu bringen ist, während aus den unreifen Samenkörnern nur eine sehr geringe Asparaginmenge mit Mühe isoliert werden konnte. Ferner enthielten die Hülsen Tryptophan, dessen Nachweis in den unreifen Samenkörnern nicht gelang. Letztere enthielten dagegen etwas Glutamin und etwas Vernin (Guanosin), während diese Stoffe aus den Hülsen nicht dargestellt werden konnten. Eine bedeutende Verschiedenheit zeigte sich ferner im Gehalt an Arginin:

¹⁾ Bd. LXV, S. 431.

die unreifen Samenkörner enthielten diese Base in bedeutender, die Hülsen dagegen nur in äußerst geringer Quantität. Ähnliche Verschiedenheiten im Stoffgehalt zeigten sich bei den von U. Pfenninger¹⁾ in unserem Laboratorium untersuchten unreifen Samenkörnern und Samenhülsen von *Phaseolus vulgaris*. Die Hülsen enthielten Asparagin in beträchtlicher Quantität, daneben auch Allantoin; aus den unreifen Samen konnte dagegen keiner dieser beiden Stoffe isoliert werden. Ferner fand sich in den Hülsen Arginin nur in sehr kleiner Menge; ganz junge Samenkörner enthielten dagegen so viel Arginin, daß der Gehalt davon 0.5% der Samentrockensubstanz ausmachte (in den in der Reife etwas mehr vorgeschrittenen Samen war jedoch der Arginingehalt bedeutend niedriger).

Auf die aus diesen Beobachtungen abgeleiteten Schlussfolgerungen komme ich weiter unten zurück: zunächst teile ich die Resultate mit, die bei einer später ausgeführten Untersuchung der unreifen Früchte der Wicke (*Vicia sativa* L.) sich ergaben. Diese Früchte wurden in der zweiten Hälfte des Monats August geerntet und dann sofort in die Samenkörner und die Hülsen zerlegt: das Gewicht der Samenkörner betrug 1780 g (mit 598.1 g Trockensubstanz), dasjenige der Hülsen 1930 g (mit 488.3 g Trockensubstanz). Beide Teile wurden nun im frischem Zustande möglichst fein zerkleinert und hierauf mit Wasser extrahiert. Die Samen behandelten wir wegen ihres bedeutenden Stärkemehlgehaltes bei einer Temperatur von nur 50° C.²⁾ mit Wasser, während die Hülsen bei einer etwas höheren Temperatur extrahiert wurden. Die durch Abfiltrieren und Abpressen des Rückstandes gewonnenen Extrakte wurden nach Entfernung der durch Bleiessig fällbaren Bestandteile mit

¹⁾ Eine vorläufige Mitteilung über diese Untersuchung ist in den Berichten der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Bd. XXVII, S. 227, gemacht worden.

²⁾ Die zerkleinerten Samen wurden mit Wasser übergossen, dessen Temperatur ca. 60° betrug; das Gemisch der Samen mit Wasser hatte dann eine Temperatur von ca. 50° C. Nach mehrstündigem Stehen wurden die Extrakte vom Rückstande getrennt. In der gleichen Weise sind auch die Extrakte dargestellt worden, die wir zu den in unserer ersten Mitteilung beschriebenen Versuchen verwendeten.

Mercurinitrat versetzt. Die durch dieses Reagens hervorgebrachten Niederschläge wurden abfiltriert, mit kaltem Wasser ausgewaschen, abgepreßt, dann in Wasser verteilt und mittels Schwefelwasserstoff zersetzt, die vom Schwefelquecksilber abfiltrierten Lösungen neutralisiert und in gelinder Wärme bis zur Sirupkonsistenz eingeengt.

Die bei Verarbeitung der unreifen Samen in solcher Weise erhaltene Lösung lieferte nach dem Erkalten eine Ausscheidung, die aus feinen, in kaltem Wasser sehr schwer löslichen Krystallen bestand; letztere wurden aus kochendem Wasser umkrystallisiert. Dieses Produkt konnte an seinen Reaktionen als Vicin erkannt werden:¹⁾ sein Gewicht betrug nach dem Umkrystallisieren 1,1 g. Die davon abfiltrierte Flüssigkeit versetzten wir zur Entfernung des darin enthaltenen Arginins mit Phosphorwolframsäure, wobei ein sehr starker Niederschlag entstand. Die von diesem Niederschlage durch Filtration getrennte Flüssigkeit wurde, nachdem sie mit Hilfe von Bleiessig von der überschüssigen Phosphorwolframsäure befreit worden war, wieder mit Mercurinitrat versetzt, der dabei entstandene Niederschlag nach dem Abfiltrieren und Auswaschen mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Schwefelquecksilber abfiltrierte Lösung wurde neutralisiert und sodann in gelinder Wärme eingedunstet; dabei wurde ein Sirup erhalten, aus welchem erst nach Zusatz von Weingeist Krystalle sich abschieden. Diese Krystalle, deren Trennung von der Mutterlauge mit Hilfe einer Tonplatte erfolgte, besaßen nach dem Umkrystallisieren das Aussehen des Asparagins und gaben auch die Reaktionen dieses Amids. Sie wurden beim Erhitzen sowohl mit verdünnter Salzsäure wie mit verdünnter Natronlauge unter Ammoniakbildung zersetzt: ihre wässrige Lösung gab beim Erhitzen mit Kupferacetat eine krystallinische, im Aussehen mit Asparaginkupfer übereinstimmende Ausscheidung und wurde auch durch Mercurinitrat gefällt. Daß nicht Glutamin vorlag, wurde durch das Aussehen und durch den

¹⁾ Die Reaktionen des bekanntlich von Ritthausen in den Wicken-samen entdeckten Vicins sind auch in dieser Zeitschrift, Bd. XV, S. 147, angegeben.

Wassergehalt der Krystalle bewiesen. Die Ausbeute an Asparagin war nur sehr gering: sie betrug nur 0,11 g (bei Anwendung von fast 600 g Samentrockensubstanz). Der in oben beschriebener Weise erhaltene Phosphorwolframsäureniederschlag wurde nach bekanntem Verfahren verarbeitet. Die «Histidinfraktion» des durch Silbernitrat und Barytwasser erhaltenen Niederschlages lieferte eine Lösung, aus der eine in kaltem Wasser sehr schwer lösliche Substanz in kleiner Menge auskrystallisierte. Diese Substanz erwies sich als Vicin. Die von den Krystallen getrennte Mutterlauge gab die Paulische Histidinreaktion: doch gelang es nicht, Histidinchlorid in Krystallen zu gewinnen. Aus der «Argininfraktion» jenes Niederschlages konnte Arginin dargestellt werden. Diese Base wurde zunächst in das Nitrat übergeführt: dasselbe wog als Rohprodukt 0,861 g. Das daraus dargestellte Argininkupfernitrat krystallisierte in der charakteristischen Form:¹⁾ die durch Umkrystallisieren gereinigte Verbindung schmolz bei 112—113° (für Argininkupfernitrat wird bekanntlich 112—114° als Schmelzpunkt angegeben). Das bei Zerlegung der Kupferverbindung erhaltene Nitrat gab die Reaktionen des Argininnitrats (Fällung durch Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Kaliumwismutjodid und Nesslerisches Reagens, keine Fällung durch Kaliumquecksilberjodid). Das Arginin wurde, wie aus den oben gemachten Angaben hervorgeht, aus dem Mercurinitratniederschlage gewonnen: da nun nach den von uns gemachten Erfahrungen das Arginin aus den Pflanzenextrakten durch Mercurinitrat nur unvollständig gefällt wird, so ist anzunehmen, daß die in den unreifen Samenkörnern enthaltene Quantität der genannten Base die oben angegebene Zahl noch übersteigt.

Der bei Verarbeitung der unreifen Samenhülsen in oben beschriebener Weise durch Mercurinitrat erhaltene Niederschlag lieferte bei der Zerlegung eine Lösung, aus der auch nach starkem Einengen eine Ausscheidung von Vicin nicht erfolgte. Sie wurde mit Wasser verdünnt und sodann zur Entfernung

¹⁾ Die von den Krystallen getrennte Mutterlauge wurde, nachdem sie mittels Schwefelwasserstoff vom Kupfer befreit worden war, auf Guanidin untersucht: doch war das Resultat negativ.

des Arginins mit Phosphorwolframsäure versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat mit Hilfe von Bleiessig von der überschüssigen Phosphorwolframsäure befreit und sodann wieder mit Mercurinitrat versetzt. Dabei entstand eine starke Fällung, die bei der Zerlegung mittels Schwefelwasserstoff Asparagin lieferte. Letzteres wurde mit Hilfe einer Tonplatte von der Mutterlauge getrennt und sodann aus Wasser umkrystallisiert. Die Krystalle stimmten im Aussehen mit Asparagin überein und gaben alle oben angegebenen Reaktionen dieses Amids. Eine Krystallwasserbestimmung lieferte folgendes Resultat:

0,1825 g verloren bei 100° 0,0219 g = 12,0% an Gewicht.

Die Theorie verlangt für Asparagin einen Krystallwassergehalt von 12,0%. Die Ausbeute an Asparagin war hier weit größer, mindestens viermal so groß als bei den unreifen Samenkörnern.

Das Filtrat vom ersten Mercurinitratniederschlag (man vgl. die obige Angabe) wurde mittels Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit, dann mit Baryt neutralisiert und hierauf stark eingeengt. Nachdem die Flüssigkeit mit Schwefelsäure stark angesäuert und durch Filtration vom ausgeschiedenen Baryumsulfat befreit worden war, wurde sie mit Phosphorwolframsäure versetzt. Den dabei entstandenen Niederschlag vereinigten wir mit der Fällung, die durch das gleiche Reagens in der bei Zerlegung des Mercurinitratniederschlages erhaltenen Lösung hervorgebracht worden war, und verarbeiteten ihn sodann nach bekanntem Verfahren. Die «Argininfraktion» des in der Basenlösung durch Silbernitrat und Barytwasser erzeugten Niederschlages lieferte bei der Zerlegung Arginin. Letzteres wurde in Argininkupferniträt übergeführt. Diese Verbindung krystallisierte in der charakteristischen Form.¹⁾ Die durch mehrmaliges Umkrystallisieren gereinigten Krystalle schmolzen bei 113° . Das bei Zerlegung der Kupferverbindung mittels Schwefelwasserstoff erhaltene Nitrat gab die oben angegebenen Reaktionen des Argininnitrats.

Wie aus den vorstehenden Mitteilungen zu ersehen ist.

¹⁾ D. h. in dünnen, dunkelblauen, zu Drusen vereinigten Prismen.

sind nicht nur bei *Pisum sativum* und *Phaseolus vulgaris*, sondern auch bei *Vicia sativa* die unreifen, als Reservestoffbehälter dienenden Samenhülsen weit reicher an Asparagin, als die unreifen Samenkörner.¹⁾ Dieser Befund läßt sich durch die früher schon ausgesprochene Annahme erklären, daß in den reifenden Samen das Asparagin rasch zur Proteinsynthese verwendet wird. Dagegen zeigten bei allen drei Pflanzenarten die unreifen Samen einen höheren Arginingehalt, als die unreifen Samenhülsen. Allerdings war bei *Vicia sativa* der Unterschied nicht so groß, wie bei *Pisum sativum* (was wahrscheinlich dadurch bedingt wurde, daß die von uns untersuchten *Vicia*-Samen der Reife schon weit näher waren); immerhin ließ sich doch auch dort aus den unreifen Samenkörnern bei Anwendung der gleichen Materialmenge mehr Arginin gewinnen, als aus den Hülsen. Bei *Phaseolus vulgaris* waren, wie früher erwähnt wurde, insbesondere die ganz jungen Samenkörner relativ reich an Arginin. Läßt sich nun auch bei *Vicia sativa* die Verschiedenheit im Gehalt der Samenkörner und Samenhülsen an Arginin wohl durch die Annahme erklären, daß das aus den Hülsen in die reifenden Samen übergehende Arginin in den letzteren nur sehr langsam zur Proteinsynthese verwendet wird,²⁾ so scheint doch diese Annahme nicht zu genügen, um den hohen Arginingehalt der unreifen Samen von *Pisum sativum* zu erklären: man scheint hier, wie schon in unserer ersten Mitteilung gesagt wurde, an eine Bildung von Arginin in den reifenden Samen denken zu müssen. Doch konnten wir diese

¹⁾ Wir haben nicht den Versuch gemacht, diesen Befund durch Ausführung von Asparaginbestimmungen nach Sachsses Methode zu bestätigen, denn die an *Phaseolus vulgaris* gemachten Beobachtungen führten zu der Schlußfolgerung, daß man bei Anwendung dieser Methode auf die unreifen Leguminosensamen keine brauchbaren Resultate erhält. Obwohl aus den unreifen *Phaseolus*-Samen in wiederholten Versuchen kein Asparagin isoliert werden konnte, entstand doch beim Erhitzen der von Eiweißstoffen befreiten Extrakte aus diesen Samen mit Salzsäure eine nicht unbeträchtliche Ammoniakmenge.

²⁾ Daß hier das in den unreifen Samen enthaltene Arginin gar nicht für die Proteinsynthese verwendet wird, ist unwahrscheinlich; auch ist darauf hinzuweisen, daß bei *Pisum sativum* eine Abnahme der Argininsmenge in den Samen während des Reifens nachgewiesen werden konnte.

Schlußfolgerung nur mit Vorbehalt aussprechen. Denn die reifenden Samen erhalten die als Material für die Proteinsynthese dienenden Stickstoffverbindungen ohne Zweifel nur zum Teil aus den Samenhülsen; zum Teil fließen ihnen diese Verbindungen aus den Blättern und Stengeln der Pflanzen zu, ohne zuvor Bestandteile der Hülsen zu werden.¹⁾ Bei dieser Sachlage ist es nun von Interesse, die Beschaffenheit der in den Blättern und Stengeln der Leguminosen enthaltenen nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen zu kennen.

Darüber haben Untersuchungen Aufschluß gegeben, die wir teils schon vor längerer Zeit, teils erst vor kurzem in Ausführung brachten. Als Material für diese Untersuchungen verwendeten wir junge Pflanzen, bei denen die Bildung der Samen noch nicht begonnen hatte. Solche Pflanzen sind reicher an Stickstoffverbindungen, als ältere, in denen infolge des Abfließens dieser Verbindungen in die Früchte sowie infolge der zunehmenden Verholzung der prozentige Stickstoffgehalt stark verringert ist: sie sind daher ein Material, aus dem jene Verbindungen sich leichter darstellen lassen. Gegen die Verwendung solcher Pflanzen für den genannten Zweck würde nur dann ein Einwand zu erheben sein, wenn man annehmen müßte, daß die Blätter und Stengel der Leguminosen während der Bildung der Früchte andere nichtproteinartige Stickstoffverbindungen enthielten, als in den früheren Vegetationstadien: für diese Annahme liegt aber nicht der geringste Grund vor.

Für die früher ausgeführten Untersuchungen²⁾ dienten als Objekte junge dem Felde entnommene Pflanzen von *Vicia sativa*, *Trifolium pratense* (Rotklee) und *Medicago sativa* (Luzerne), welche dicht über dem Boden abgeschnitten worden waren. Von *Trifolium pratense* gelangten zwei von verschiedenen Orten stammende Muster junger Pflanzen zur Untersuchung: dieselben hatten eine Höhe von 15, bzw. 30 cm über

¹⁾ Es ist anzunehmen, daß nur ein Teil der aus den Stengeln und Blättern der Pflanze den Früchten zufließenden Stoffe in die Samenhülsen übergeht und sich hier vorübergehend als Reservematerial anhäuft.

²⁾ Landwirtschaftliche Versuchsstationen, Bd. XXXIII, S. 89, und Bd. XLVI, S. 383.

dem Boden erreicht. Die *Medicago*-Pflanzen wurden in fünf Vegetationsstadien untersucht. Die dem ersten Stadium angehörenden Pflanzen besaßen eine Höhe von 30 cm und waren im Mai geerntet worden: die am 21. Juni geernteten Pflänzchen der letzten Entwicklungsperiode befanden sich in voller Blüte. Von *Vicia sativa* gelangten vier Muster zur Verwendung; die ältesten dieser Pflänzchen hatten schon Blüten angesetzt. Aus allen diesen Pflanzen konnte Asparagin dargestellt werden und zwar meistens in beträchtlicher Quantität. Die Pflanzen von *Vicia sativa* und *Trifoleum pratense* lieferten daneben auch Vernin (Guanosin); seine Menge war am größten bei *Vicia sativa*. Aus allen für die Untersuchung verwendeten Pflanzen konnten ferner Alloxurbasen zur Abscheidung gebracht werden. Aus den Pflanzen von *Vicia sativa* ließ sich ferner etwas Leucin gewinnen; auch die Pflanzen von *Medicago sativa* lieferten eine kleine Quantität einer Substanz, welche Leucin zu sein schien. Ohne Zweifel war das Asparagin diejenige nichtproteinartige Stickstoffverbindung, die in allen Objekten in relativ größter Quantität sich vorfand. Aus Bestimmungen des Asparagingehaltes, die nach R. Sachsses Verfahren ausgeführt wurden, ergaben sich für die Trockensubstanz der Pflanzen folgende Zahlen:

<i>Vicia sativa</i> A.	1,98%
» B.	1,72%
<i>Trifoleum pratense</i> A.	1,93%
» » B.	1,18%
<i>Medicago sativa</i> A.	2,03%
» » B.	1,04%

Außer dem Asparagin wurde in diesen Pflanzen nach Stutzers Verfahren auch die auf nichtproteinartige Verbindungen fallende Stickstoffmenge bestimmt; von dieser Stickstoffmenge fielen auf Asparagin 26,4—36,9% (unter der wahrscheinlich nicht ganz zutreffenden Voraussetzung, daß das beim Erhitzen der Extrakte mit Salzsäure nach Sachsses Verfahren entstandene Ammoniak ausschließlich aus Asparagin abgespalten worden war).¹⁾ Aus Versuchen, hinsichtlich deren ich auf die

¹⁾ Neben Asparagin kann z. B. etwas Glutamin vorhanden ge-

zitierte Abhandlung verweise, war zu schließen, daß auf Monoaminosäuren (Leucin, usw.) und auf die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Basen keine große Stickstoffquantität fiel: jedenfalls wurde durch diese Stoffe nicht der nach Abzug des Asparaginstickstoffs vom «Nichtproteinstickstoff» übrig bleibende Rest gedeckt. Neben den im vorigen genannten nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen mußten also noch andere Stoffe solcher Art vorhanden sein, die sich dem Nachweis entzogen. Daß zu denselben auch Polypeptide¹⁾ gehörten, muß als möglich bezeichnet werden.

Es ist hier noch zu erwähnen, daß der Asparagingehalt junger Leguminosenpflanzen sich stark vermehrte, wenn man diese Pflanzen einige Tage lang im Dunkeln aufbewahrte.²⁾

Bei Ausführung der im vorigen besprochenen Untersuchungen wurde ein Gehalt der Pflanzen an Arginin, Lysin und Histidin nicht berücksichtigt. Im Hinblick auf die von uns nachgewiesene Anhäufung von Arginin in unreifen Leguminosensamen mußte es aber für wünschenswert erklärt werden, auch die Stengel und Blätter der betreffenden Pflanzen auf Arginin zu untersuchen. Wir verwendeten für diesen Zweck junge Pflanzen von *Vicia sativa* und von *Pisum sativum*.³⁾ Die ersteren waren im Juni dem Felde entnommen und in einem luftigen Raume ohne Anwendung künstlicher Wärme getrocknet, dann zerkleinert worden. Wir extrahierten 1,5 kg des lufttrockenen Materials mit heißem Wasser: der Extrakt wurde nach Entfernung der durch Bleiessig fällbaren Bestandteile mit Schwefelsäure stark angesäuert und sodann mit Phosphorwolframsäure versetzt. Den durch dieses Reagens hervorgebrachten Niederschlag verarbeiteten wir nach bekanntem Verfahren. Die mit Salpetersäure neutralisierte Basenlösung gab mit Silbernitrat wesen sein; dieses Amid verhält sich aber bekanntlich beim Erhitzen mit Salzsäure gleich dem Asparagin.

1) Inwieweit diese Stoffe beim Versetzen der in beschriebener Weise dargestellten Pflanzenextrakte mit Phosphorwolframsäure in die Fällung eingehen, entzieht sich bis jetzt unserer Kenntnis.

2) Diese Zeitschrift, Bd. X. S. 420.

3) Bei Untersuchung dieser Pflanzen wurde ich von U. Pfenninger unterstützt.

eine starke Fällung, in der Alloxurbasen enthalten waren. Sie wurde unter Zusatz von Salzsäure mittels Schwefelwasserstoff zersetzt. Die vom Schwefelsilber abfiltrierte Lösung gab nach dem Einengen eine krystallinische Ausscheidung, die aus salzsauren Salzen der Alloxurbasen bestand: ihr Gewicht betrug fast 1,0 g. Die «Histidinfraktion» des durch Silbernitrat und Barytwasser hervorgebrachten Niederschlages wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die dabei erhaltene Lösung mit Mercurisulfat versetzt. Die durch dieses Reagens hervorgebrachte Fällung lieferte, als sie nach bekanntem Verfahren verarbeitet wurde, eine kleine Quantität eines Sirups, aus welchem glänzende, im Aussehen dem Histidinchlorid gleichende Krystalle sich ausschieden. Die mit Hilfe einer Tonplatte von der Mutterlauge getrennten Krystalle gaben sehr schön die Paulische Reaktion. Ferner gab die durch Umsetzung des Chlorids mit Silbernitrat erhaltene Lösung des Nitrats mit ammoniakalischem Silbernitrat eine weiße Fällung. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß hier Histidin vorlag; doch war die Ausbeute zu gering, um jene Schlußfolgerung durch eine analytische Bestimmung bestätigen zu können.

Die «Argininfraktion» des durch Silbernitrat und Barytwasser erhaltenen Niederschlages lieferte bei der Verarbeitung Arginin. Letzteres wurde zunächst in das Nitrat übergeführt: das Gewicht dieses Produktes betrug 1,16 g. Das nach bekanntem Verfahren daraus dargestellte Argininkupfernitrats besaß das charakteristische Aussehen; die durch Umkrystallisieren gereinigten Krystalle schmolzen bei 112—113°. Eine Kupferbestimmung gab folgendes Resultat:

0,3341 g Substanz im Exsikkator getrocknet gaben 0,0442 g
 $\text{CuO} = 10,57\% \text{ Cu}$.

Die Theorie verlangt für das krystallwasserhaltige Salz 10,79%. Das bei Zerlegung der Kupferverbindung mittels Schwefelwasserstoff erhaltene Nitrat stimmte im Aussehen mit Argininnitrat überein und gab die früher schon angegebenen Argininreaktionen.

Die Ausbeute an Arginin war sehr gering: sie betrug nur 0,06% der Pflanzentrockensubstanz. Aus dem Filtrat vom

Argininsilberniederschläge konnten nach bekanntem Verfahren¹⁾ Betain und Cholin zur Abscheidung gebracht werden. Den mit Hilfe von wasserfreiem Alkohol vom Betainchlorid getrennten Cholinchlorid war aber eine andere Substanz, deren nähere Untersuchung noch aussteht, beigemischt. Der Versuch, Lysin nachzuweisen, führte zwar zur Gewinnung eines im Aussehen dem Lysinpikrat ähnlichen Pikrats; doch lag der Schmelzpunkt dieses, nur in sehr geringer Menge erhaltenen, Produktes bedeutend tiefer als derjenige des Lysinpikrats (vielleicht lag ein Gemenge von Lysin mit einer anderen Substanz vor).

Zur Untersuchung auf Asparagin diente eine bei ca. 60° getrocknete Probe der Pflanzen. Aus dem Niederschlage, der in einem mittels Bleiessig gereinigten wässrigen Extrakte durch Mercurinitrat hervorgebracht wurde, konnte Asparagin in beträchtlicher Menge isoliert werden. Es sei hier bemerkt, daß in unserem Laboratorium grüne, dem Felde entnommene Pflanzen von *Vicia sativa* wiederholt (mindestens 8—9 mal) auf Asparagin untersucht worden sind,²⁾ und zwar stets mit positivem Resultat. Unter diesen Pflanzen befanden sich auch solche, die schon im Blühen waren.

Wir untersuchten ferner junge Pflanzen von *Pisum sativum*, die im Juni geerntet worden waren und eine Höhe von 35—40 cm über dem Boden erreicht hatten. Sie wurden, nach Abtrennung der Wurzeln in frischem Zustande untersucht. Nachdem sie zerkleinert worden waren, extrahierten wir sie mit heißem Wasser. Der Extrakt wurde von den durch Bleiessig fällbaren Substanzen befreit, dann mit Schwefelsäure stark angesäuert und hierauf mit Phosphorwolframsäure versetzt. Den durch dieses Reagens hervorgebrachten Niederschlag verarbeiteten wir in bekannter Weise. Dabei konnten Alloxurbasen nachgewiesen werden; es gelang aber nicht, Arginin und Histidin zu isolieren. Zwar erhielten wir beim

¹⁾ Dieses Verfahren ist in dieser Zeitschrift, Bd. LX, S. 155 beschrieben worden.

²⁾ Der Zweck der wiederholten Untersuchung der *Vicia*-Pflanzen war u. a. die Gewinnung von Vernin (Guanosin); doch konnte diese Substanz nicht immer in solchen Pflanzen aufgefunden werden.

Fällen der Basenlösung mit Silbernitrat und Barytwasser eine «Histidinfraktion» und eine «Argininfraktion». Bei Verarbeitung dieser Fraktionen konnte aber weder die eine noch die andere jener beiden Basen isoliert werden. Statt Argininnitrat erhielten wir einen Sirup, der nicht zum Krystallisieren zu bringen war und beim Erhitzen mit Kupfercarbonat nicht eine blaue, sondern nur eine schwach grün gefärbte Lösung gab: enthielt dieser Sirup also Arginin, so konnte letzteres doch jedenfalls nur in sehr kleiner Menge vorhanden sein. Aus dem Filtrat vom Argininsilberniederschlage konnten in bekannter Weise Trigonellin und Cholin gewonnen werden.

Während die oberirdischen Teile dieser Pflanzen kein Arginin lieferten, konnte dagegen aus den Wurzeln unter Einhaltung des gleichen Verfahrens eine kleine Menge dieser Base isoliert werden: die Ausbeute an Argininnitrat betrug jedoch nur ca. 0,1 g. Das daraus dargestellte Argininkupfernitratschmolz nach dem Umkrystallisieren bei 114—115°. Das bei Zerlegung der Kupferverbindung mittels Schwefelwasserstoff erhaltene Nitrat gab die Argininreaktionen.

Zur Untersuchung auf Asparagin dienten die bei ca. 60° getrockneten Pisum-Pflanzen. Aus einem mit heißem Wasser dargestellten Extrakt konnte nach bekanntem Verfahren mit Hilfe von Mercurinitrat leicht Asparagin in beträchtlicher Menge isoliert werden. Die Asparaginkrystalle wurden mit Hilfe ihrer Reaktionen identifiziert; auch wurde eine Bestimmung des Krystallwassers mit folgendem Resultat ausgeführt:

0,1740 g Substanz verloren bei 100° 0,0211 g = 12,1% an Gewicht.

Die Theorie verlangt für Asparagin einen Krystallwassergehalt von 12,0%.

Der Mercurinitratniederschlag lieferte neben Asparagin eine kleine Quantität eines Produktes, das allem Anschein nach Vernin (Guanosin) war. Dieses Produkt war anfangs gallertartig, wurde aber nach dem Wiederauflösen in Wasser krystallinisch. Es glich nun im Aussehen dem Vernin: das daraus dargestellte Pikrat besaß das Aussehen des Verninpikrats und schmolz fast gleichzeitig mit einer Kontrollprobe dieses Pikrats.

Das negative Resultat, das wir bei Untersuchung der Pisum-Pflanzen auf Arginin und Histidin erhielten, steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen, die in unserem Laboratorium früher an zwei anderen Leguminosen, nämlich an *Trifolium pratense* und *Medicago sativa*, gemacht worden sind. Auszügen, über dem Boden abgeschnittenen Pflanzen solcher Art, die in frischem Zustande verarbeitet wurden, konnte weder Arginin noch Histidin dargestellt werden.¹⁾

Pflanzen solcher Art lieferten aber Arginin, nachdem sie, mit den abgeschnittenen Stengeln in Wasser gesteckt, 2—3 Tage lang in einem verdunkelten Raume belassen worden waren. Während der Verdunkelung war also, ohne Zweifel infolge des Zerfalls von Proteinstoffen, eine kleine Quantität von Arginin entstanden (wahrscheinlich hatte sich daneben auch etwas Histidin gebildet). Diese Wahrnehmungen lassen es aber als möglich erscheinen, daß das in den Vicia-Pflanzen vorgefundene Arginin teilweise oder ganz erst während des Trocknens dieser Pflanzen sich gebildet hatte. Denn das Trocknen erfolgte ohne Anwendung erhöhter Temperatur in einem verdunkelten Raume; es ist daher möglich, daß in den zum Trocknen hingelegeten Pflanzen, so lange als dieselben noch genügend Feuchtigkeit enthielten, die mit dem Leben verbundenen Vorgänge, u. a. auch der Zerfall von Proteinstoffen, fort dauerten.²⁾

Mag nun aber diese Vermutung richtig sein oder nicht, so steht es doch jedenfalls fest, daß die jungen Leguminosenpflanzen nur eine höchst geringe Menge von Arginin enthielten. Insbesondere gilt dies für die Pflanzen von *Pisum sativum*:

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 72 (Versuche von A. Kiesel) und Landwirtschaftliche Jahrbücher, Bd. XXXV, S. 665.

²⁾ Man nimmt an, daß die Bildung von Asparagin, Arginin usw. in den in einen verdunkelten Raum gebrachten Pflanzen kein pathologischer Prozeß ist. Denn die gleichen Stoffe können ja auch in den unter normalen Bedingungen sich entwickelnden Pflanzen entstehen: sie können sich aber anhäufen, wenn man die Pflanzen in der oben angegebenen Weise unter abnormen Bedingungen vegetieren läßt. Zu bemerken ist noch, daß man zur Erreichung dieses Zieles die Pflanzen nicht vollständig vom Licht abzuschließen braucht.

nur aus den Wurzeln dieser Pflanzen konnte ein wenig Arginin isoliert werden, während die oberirdischen Teile nichts lieferten. Auch die unreifen Samenhülsen der gleichen Pflanze enthielten nur eine sehr kleine Menge der genannten Base. Läßt sich nun aus diesen Wahrnehmungen auch nicht mit Sicherheit schließen, daß die den reifenden Samen aus den übrigen Pflanzenteilen zufließende Argininmenge ganz unbedeutend war,¹⁾ so erhöht sich doch durch dieselben ohne Zweifel die Wahrscheinlichkeit der von uns ausgesprochenen Annahme, daß bei *Pisum sativum* eine Bildung von Arginin in den Samen erfolgte. Findet aber bei *Pisum sativum* ein solcher Vorgang statt, so ist es nicht unwahrscheinlich, daß derselbe auch bei *Vicia sativa* und *Phaseolus vulgaris* sich vollzieht; denn auch bei diesen Pflanzen waren die unreifen Samen reicher an Arginin, als diejenigen Pflanzenteile, aus denen den Samen stickstoffhaltige Stoffe zuströmten.

Rückblick auf die Ergebnisse der Untersuchungen über die Proteinbildung in reifenden Pflanzensamen.

A. Emmerling²⁾ hat aus seinen Studien über die Eiweißbildung in der Pflanze, für die er *Vicia Faba* als Objekt benutzte, die Schlußfolgerung abgeleitet, daß nichtproteinartige organische Stickstoffverbindungen, deren Bildungsstätte vorzugsweise die Blätter sind, den reifenden Samen zugeleitet und in diesen zur Eiweißsynthese verwendet werden. Diese Schlußfolgerung, für die auch die Beobachtungen Zaleskis³⁾ eine Stütze bilden, hat meines Wissens allgemeine Zustimmung gefunden. Emmerling schloß aus seinen Versuchen, daß zu jenen Stickstoffverbindungen neben Stoffen, die sich beim Erhitzen mit verdünnten Säuren gleich dem Asparagin verhalten.

¹⁾ Auch aus Pflanzenteilen, deren Prozentgehalt an Arginin höchst gering ist, kann den reifenden Samen innerhalb eines gewissen Zeitraumes eine ansehnliche Menge dieser Base zufließen, falls ihr Übergang in den Samen sehr rasch erfolgt.

²⁾ Landwirtschaftliche Versuchsstationen, Bd. XXXIV, S. 1; Bd. LIV, S. 215.

³⁾ Berichte der D. Botanischen Gesellschaft, 1905, Bd. XXIII, S. 126.

auch Aminosäuren gehören; doch stellte er nicht fest, welche Glieder dieser Stoffgruppen vorhanden waren. Später hat N. Wassiliew¹⁾ gezeigt, daß aus unreifen Leguminosensamen Asparagin, Arginin, Histidin und Monoaminosäuren (Phenylalanin und eine wahrscheinlich mit Aminovaleriansäure identische Substanz) sich darstellen lassen²⁾. Auch E. Schulze und E. Winterstein (loc. cit.), sowie U. Pfenniger (loc. cit.) haben in unreifen Leguminosensamen solche Stickstoffverbindungen nachgewiesen.

In unserer ersten Mitteilung wurde darauf aufmerksam gemacht, daß für die Entscheidung der Frage, welche Stickstoffverbindungen in den reifenden Samen vorzugsweise als Material für die Proteinsynthese dienen, die bei Untersuchung solcher Samen erhaltenen Ergebnisse für sich allein nicht von großer Bedeutung sind. Denn es ist anzunehmen, daß für diese ohne Zweifel sehr rasch verlaufende Synthese manche der den Samen aus den übrigen Pflanzenteilen zufließenden Stickstoffverbindungen sehr schnell, andere dagegen langsam oder auch gar nicht verwendet werden. Der Rest solcher Verbindungen, den man in den unreifen Samen neben Protein vorfindet, kann also von dem diesen Samen aus anderen Pflanzenteilen zufließenden Gemenge nicht proteinartiger Stickstoffverbindungen in bezug auf seine Beschaffenheit weit abweichen. Es ist aber von Interesse, jenen Rest mit dem den Samen zufließenden Stoffgemenge zu vergleichen. Über die Zusammensetzung dieses Stoffgemenges haben wir durch die Untersuchung nicht nur der während des Reifens der Samen als Reservestoffbehälter dienenden Samenhülsen, sondern auch der Blätter und Stengel junger Leguminosenpflanzen Aufschluß erhalten. Es hat sich gezeigt, daß aus diesen Objekten das Asparagin in größerer Quantität sich darstellen ließ, als irgend eine andere nichtproteinartige Stickstoffverbindung. Die unreifen Samen enthielten dagegen dieses Amid nur in sehr kleiner Menge: bei *Phaseolus vulgaris* lieferte sogar die Untersuchung der unreifen Samen

¹⁾ Journal für experimentelle Landwirtschaft (russisch), 1904, S. 34.

²⁾ Auch aus den Samenhülsen hat Wassiliew einige Stoffe solcher Art dargestellt.

auf Asparagin ein negatives Resultat. Dieser Befund entspricht der Annahme, daß in den reifenden Samen das Asparagin zur Proteinbildung verwendet wird. Die gleiche Verwendung findet dieses Amid ohne Zweifel auch in jungen Blättern. Wenn man am Licht gewachsene Leguminosenkeimpflanzen untersucht, so findet man, daß die Stengel sehr reich an Asparagin sind. In den jungen grünen Blättchen findet man dagegen nur wenig von diesem Amid vor: man kann ferner leicht feststellen, daß die Blattspreiten weit asparaginärmer sind, als die Blattstiele.¹⁾ Läßt man aber die Keimpflanzen bei Lichtabschluß vegetieren, dann werden auch die jungen, in diesem Falle freilich nur schwach entwickelten, Blättchen sehr asparaginreich. Alle Beobachtungen sprechen also für die Annahme, daß eine rasche Verwendung des Asparagins für die Proteinsynthese stattfindet.

In den Keimpflanzen der Leguminosen finden sich neben dem den jungen Blättern zufließenden Asparagin noch zahlreiche andere nichtproteinartige Stickstoffverbindungen vor, z. B. Leucin, Valin, Arginin, Histidin usw. Ihre Menge ist meistens nur gering; in der Regel fällt auf das Asparagin ein größerer Teil des Gesamtstickstoffs, als auf alle jene Verbindungen zusammen. Neben den bis jetzt nachgewiesenen Stoffen solcher Art finden sich aber in den Keimpflanzen ohne Zweifel noch andere Stickstoffverbindungen vor, deren Isolierung bis jetzt nicht gelungen ist. Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei den Samenhülsen, sowie bei den Blättern und Stengeln der Leguminosen. Auch hier konnten neben Asparagin noch manche andere nichtproteinartige Stickstoffverbindungen nachgewiesen werden, z. B. Leucin, Tyrosin, Arginin, Lysin, Histidin usw. Die Quantität dieser anderen Stickstoffverbindungen war jedoch ohne Zweifel weit geringer, als diejenige des Asparagins. Auch hier waren aber neben den nachgewiesenen Verbindungen solcher Art ohne Zweifel noch andere vorhanden, die sich bisher dem Nachweis entzogen.

Bei den Leguminosen besitzt demnach ohne Zweifel das den reifenden Samen als Material für die Proteinsynthese zu-

¹⁾ Nach Versuchen von E. Schulze und N. Castoro, diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 247; auch Wassilieff hat das Gleiche gefunden

zuziehende Gemenge nichtproteinartiger Stickstoffverbindungen in seiner Zusammensetzung große Ähnlichkeit mit dem den jungen Blättern aus den übrigen Teilen der Keimpflanzen zugeführten Stoffgemenge. Dies spricht für die Annahme, daß in den reifenden Samen die Proteinsynthese in der gleichen Weise verläuft, wie in den jungen Blättern. Wie aber der Verlauf dieses Prozesses ist, wissen wir bis jetzt nicht.

In den unreifen Leguminosensamen finden sich neben Proteinen kleine Mengen von Asparagin, Monoaminosäuren, Arginin, Histidin usw. vor. Dies ist leicht erklärlich. Denn es ist anzunehmen, daß die Bildung von Proteinen auf Kosten der aus den Samenhülsen, sowie aus den Blättern und Stengeln den unreifen Samen zufließenden Stickstoffverbindungen eine gewisse Zeit beansprucht und erst in der Reife der Samen ihr Ende erreicht: untersucht man also die unreifen Samen in irgend einem Zeitpunkte, so wird man in ihnen neben Proteinen noch einen Rest jener Stickstoffverbindungen vorfinden. Es war von Interesse, diesen Rest mit dem dem Samen aus den übrigen Pflanzenteilen zufließenden Gemenge nichtproteinartiger Stickstoffverbindungen zu vergleichen. Dabei zeigte sich u. a., daß nur in den Samenhülsen, nicht aber in den unreifen Samen, Tryptophan nachzuweisen war. Dies läßt sich erklären, indem man annimmt, daß das aus den Hülsen in die reifenden Samen übergehende Tryptophan hier sehr rasch für die Proteinsynthese verwendet wurde und sich infolge davon nicht mehr in einer für den Nachweis genügenden Menge vorfand. Andererseits wurde gefunden, daß die unreifen Samen etwas Glutamin enthielten, während dieses Amid in den Samenhülsen, sowie in den Blättern und Stengeln bis jetzt nicht nachgewiesen worden ist. Man kann dies durch die Annahme erklären, daß in dem aus den übrigen Pflanzenteilen den reifenden Samen zufließenden Stoffgemenge neben Asparagin ein wenig Glutamin sich findet, daß letzteres aber für die Proteinsynthese langsamer, als das Asparagin, verbraucht wird und infolge davon sich in gewissem Grade anhäuft. Ob man aber in der gleichen Weise den großen Unterschied erklären kann, der in bezug auf den Arginingehalt

zwischen den unreifen Samen und den übrigen Pflanzenteilen sich zeigte, muß als fraglich erklärt werden: man scheint also hier an eine synthetische Bildung des Arginins in den reifen Samen denken zu müssen. Wenn nun aber der Proteinsynthese die synthetische Bildung einzelner Bausteine des Proteinmoleküls vorangeht, so ist der ganze Vorgang ein recht verwickelter.

In unserer ersten Mitteilung (*loc. cit.*) haben wir es für sehr unwahrscheinlich erklärt, daß der Verlauf der Proteinsynthese in den Pflanzen binnen kurzem aufgeklärt werden würde; wir bezeichneten es als die nächstliegende Aufgabe, das bezügliche Beobachtungsmaterial zu vermehren, um so nach und nach eine für den Aufbau einer Theorie geeignete Grundlage zu gewinnen. Daß wir der Lösung dieser Aufgabe näher gekommen sind, darf wohl behauptet werden. Denn auf die von A. Emmerling offen gelassene Frage, welche einzelnen Stoffe den reifenden Samen aus den übrigen Pflanzenteilen zufließen, kann jetzt eine Antwort gegeben werden, da bei den Leguminosen nicht nur aus den als Reservestoffbehälter dienenden Samenhülsen, sondern auch aus den Blättern und Stengeln eine Anzahl von nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen isoliert worden ist: freilich ist diese Antwort keine erschöpfende, da neben den aus jenen Pflanzenteilen isolierten Stickstoffverbindungen ohne Zweifel noch andere vorhanden sind, die sich bis jetzt dem Nachweis entzogen haben. Ferner besitzen wir über die in den unreifen Samen neben Proteinen sich vorfindenden Stickstoffverbindungen Kenntnisse, aus denen gewisse Schlußfolgerungen sich ableiten lassen. Auch diese Kenntnisse sind aber noch lückenhaft. Es muß demgemäß für möglich erklärt werden, daß sowohl in den unreifen Samen, wie in den übrigen Pflanzenteilen, neben den bis jetzt isolierten stickstoffhaltigen Stoffen andere sich vorfinden, die für die Proteinbildung von Bedeutung sind, bisher aber dem Nachweise sich entzogen haben.