

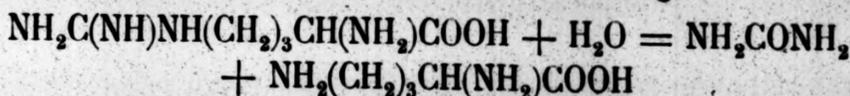
Über den fermentativen Abbau des Arginins in Pflanzen.

Von
Alexander Kiesel.

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Heidelberg.)
(Der Redaktion zugegangen am 4. August 1911.)

Unter den theoretisch möglichen fermentativen Abbauarten des Arginins in Pflanzen kommen für die Untersuchung hauptsächlich diejenigen in Betracht, welche schon einerseits im Tierreiche, andererseits bei Fäulnisvorgängen aufgefunden sind.

Nach den grundlegenden Untersuchungen von A. Kossel und H. Dakin¹⁾ geht die Argininspaltung in tierischen Organen unter Wasseranlagerung vor sich, indem Ornithin und Harnstoff gebildet werden, nach der Gleichung:



Die Bildung von Ornithin aus Arginin konnte auch bei Fäulnis des letzteren von D. Ackermann²⁾ nachgewiesen werden.

Es war wahrscheinlich, daß in Pflanzen ein gleicher Prozeß vorgeht und durch ein Ferment hervorgerufen wird.

Nach den Untersuchungen von F. Kutscher und J. Otori³⁾ bildet sich bei der Autolyse von Pancreas Guanidin, welches vielleicht doch aus dem Arginin stammen könnte, wenn auch die genannten Forscher sich auf Grund des Fehlens von Bernsteinsäure in ihren Versuchen gegen eine solche Entstehungsweise des Guanidins aussprechen. Jedoch konnte die Bernsteinsäure dabei weiter verändert gewesen sein und

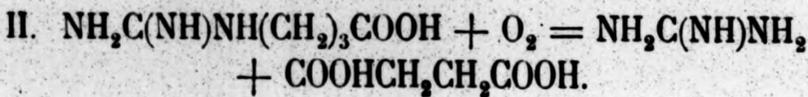
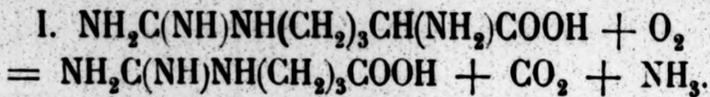
¹⁾ Diese Zeitschrift, 1904, Bd. 41, S. 321; Bd. 42, S. 181.

²⁾ Diese Zeitschrift, 1908, Bd. 56, S. 305.

³⁾ Zentralbl. f. Physiologie, 1904, Bd. 18, S. 248; Diese Zeitschrift, Bd. 43, S. 92.

zwar durch einen Prozeß, welcher dem von F. Battelli und L. Stern¹⁾ in verschiedenen tierischen Organen nachgewiesenen entspricht.

Man dürfte also auch an die Möglichkeit einer Spaltung des Arginins durch ein Ferment denken, die der Einwirkung von Baryumpermanganat auf Arginin entspricht, also oxydativer Natur wäre. Diese Spaltung verläuft nach E. Benech und F. Kutscher²⁾ bei Anwendung des Baryumpermanganats folgendermaßen:



Wie aus obigen Gleichungen zu ersehen ist, geht die oxydative Spaltung über γ -Guanidinbuttersäure, die Kutscher³⁾ dabei auch isolieren konnte, aber die noch nie in Organismen nachgewiesen worden ist.

Da das Guanidin schon öfters in Pflanzen aufgefunden wurde,⁴⁾ so dürfte diese Möglichkeit keinesfalls unbeachtet bleiben.

Nach der Entdeckung des Agmatins durch A. Kossel⁵⁾ im Heringsperma und nach der Feststellung der Identität der von F. Kutscher⁶⁾ in Mutterkornextrakt (*Secale cornutum* von *Claviceps purpurea*) aufgefundenen Base mit demselben durch R. Engeland und F. Kutscher⁷⁾ mußte man an die wahrscheinlich ebenfalls fermentative Bildung desselben aus Arginin denken und somit eine dritte Art des Abbaus des Arginins in Pflanzen für möglich halten.

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, 1910, Bd. 30, S. 172.

²⁾ Benech und Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. 32 (1901), S. 278; Kutscher, *ibid.*, S. 413.

³⁾ *l. c.*

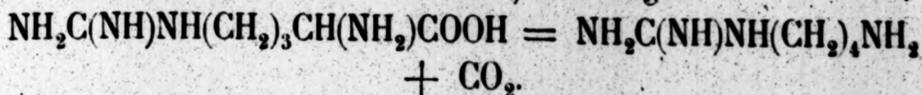
⁴⁾ E. Schulze, Diese Zeitschrift, Bd. 17; Landw. Jahrb., 1906, Bd. 35, S. 640.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 66 (1910), S. 257.

⁶⁾ Zentralbl. f. Physiologie, Bd. 24 (1910), S. 163.

⁷⁾ Zentralbl. f. Physiologie, Bd. 24 (1910), S. 479.

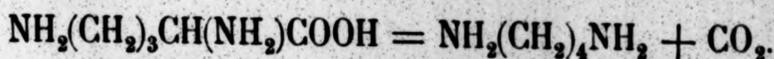
Der Prozeß würde verlaufen, wie folgt:



Die von D. Ackermann und F. Kutscher als Fäulnisabbauprodukt des Arginins angegebene δ -Aminovaleriansäure¹⁾ hat wohl einen anderen Ursprung; bei Argininfäulnis konnte nach Ackermann²⁾ keine δ -Aminovaleriansäure nachgewiesen werden.

Weiterhin mußte mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß die primär aus dem Arginin entstandenen Spaltungsprodukte nicht unverändert bleiben können, sondern einen weiteren Zerfall erleiden.

Dabei könnte aus dem Ornithin Putrescin gebildet werden, wie es in dem Fäulnisprozeß durch A. Ellinger³⁾ nachgewiesen wurde.



Da das Ornithin noch nie in Pflanzen entdeckt werden konnte,⁴⁾ war die weitere rasche Zerstörung desselben sehr zu erwarten, doch die später zu erläuternden Versuche sprechen gegen diese Annahme und geben uns eine andere Erklärung dafür.

Was das Putrescin anbetrifft, so wurde es freilich auch oft in Pflanzen erfolglos gesucht,⁴⁾ jedoch tritt es bekanntlich regelmäßig bei der Fäulnis auf.

Als sehr merkwürdig muß der Versuch von D. Ackermann⁵⁾ erscheinen, der bei Argininfäulnis eine größere Menge Ornithin nachweisen konnte, jedoch kein Putrescin fand. Die Bildung des letzteren aus Ornithin wurde, wie eben erwähnt, von Ellinger aufgefunden und es ist nicht klar, weshalb das Putrescin sich in dem Versuche von Ackermann nicht gebildet hatte. Augenscheinlich liegt der Grund in der Verschiedenheit der zu den Versuchen genommenen Bakterienarten; zerstört

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 69 (1910), S. 272.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 56 (1908), S. 305.

³⁾ Diese Zeitschrift, 1900, Bd. 29, S. 334.

⁴⁾ E. Schulze, Diese Zeitschrift, 1906, Bd. 47, S. 507.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, 1908, Bd. 56, S. 305.

konnte es wohl nicht gewesen sein, da nach den Angaben von Ackermann selbst das Putrescin sich sehr resistent gegen Fäulnis verhält.

Möglich war jedoch die Annahme, daß das Verhalten des Putrescins im Organismus selbst ein anderes ist, wie bei Fäulnis, und die gebildete Base sich hier sofort nach der Entstehung zersetzt.

Es muß noch angeführt werden, daß das Putrescin von M. Schenk¹⁾ unter den bei der Autolyse von Hefe gebildeten Produkten gefunden wurde.

Harnstoff wurde bis jetzt nur in einer Pflanze aufgefunden, nämlich in *Lycoperdon bovista*, wo seine Menge bis 3,5% der Trockensubstanz beträgt.²⁾

Der Harnstoff, dessen weitere Spaltung für tierische Organismen vollkommen wegfällt, wird, wie schon längst bekannt,³⁾ durch ein Ferment, das sehr viele Bakterien besitzen, in Ammoniak und Kohlensäure gespalten. Jedoch beschränkt sich die Anzahl der harnstoffspaltenden Pflanzenorganismen nicht nur auf die genannte Gruppe niederster Wesen, sondern es werden immer mehr Pflanzen gefunden, die den Harnstoff fermentativ spalten können.

So entdeckte K. Shibata⁴⁾ Urease in dem Schimmelpilze *Aspergillus niger*. Von T. Takeuchi⁵⁾ wurde Urease in vielen höheren Pflanzen entdeckt. Die unten angeführten Versuche vergrößern noch die Anzahl der Pflanzen, die Urease enthalten.

Über das Vorhandensein von γ -Guanidinbuttersäure in Organismen und deren Spaltung haben wir bis jetzt keine

¹⁾ Chem. Zentralbl., 1905, Bd. 2, S. 1812; Zeit. f. Spir.-Industrie, Bd. 28, S. 397, 409, 416.

²⁾ M. Bamberger und A. Landsiedl, Monatsh. f. Chemie, Bd. 24 (1903), S. 218; R. Gase, Chem. Zentralbl., 1905, Bd. 1, S. 924; Archiv d. Pharmacie, Bd. 243 (1905), S. 78.

³⁾ Literatur s. F. Czapek, Biochemie d. Pflanzen, Bd. 2, S. 106; Lafar, Handb. d. techn. Mykologie, Bd. 3.

⁴⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. 5, S. 384 (1904).

⁵⁾ Journal of Coll. Agric. Tokyo, I, Nr. 1, 1909.

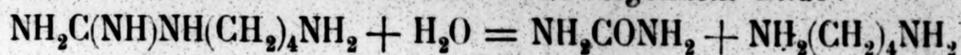
Angaben. Das Verhalten dieser Substanz muß noch durch künftige Untersuchungen klargelegt werden.

Guanidin und Bernsteinsäure hat man öfters in Pflanzen nachgewiesen, doch kann nur ein geringer Teil der letzteren aus Arginin stammen.

Eine fermentative Spaltung des Guanidins konnte noch nie nachgewiesen werden.¹⁾ Für die Unangreifbarkeit desselben durch pflanzliche Fermente spricht auch ein unten angeführter Versuch.

Für Bernsteinsäure ist eine Veränderung zu Äpfelsäure von F. Battelli und L. Stern²⁾ durch tierische Fermente nachgewiesen worden. Eine derartige Veränderung dürfte wohl auch in Pflanzenobjekten vorkommen.

Über den weiteren Abbau des Agmatins sind noch keine Angaben vorhanden. Immerhin ist eine Spaltung zu Harnstoff und Putrescin sehr annehmbar nach folgendem Bilde:



Außer den eben vorgeführten Möglichkeiten einer nur nach einer Richtung gehenden Argininspaltung in Pflanzen mußte man aber auch die Möglichkeit eines gleichzeitig nach verschiedenen Richtungen gehenden Abbaues berücksichtigen.

Daß ein fermentativer Argininabbau in Pflanzen überhaupt stattfindet, wurde von K. Shiga³⁾ für Hefe (Preßsaft) nachgewiesen. Er nahm dabei an, daß die Spaltung ebenso, wie von Kossel und Dakin für tierische Organe gezeigt wurde, zu Ornithin und Harnstoff führt; jedoch brachte er keinen Beweis für seine Annahme, indem keine Ausscheidung und Identifizierung dieser Substanzen unternommen, sondern die Bildung von Ornithin und Harnstoff aus der Zunahme des Stickstoffs in den entsprechenden Fraktionen gefolgert wurde. Dabei blieben die Zunahmen des Stickstoffs in den Fraktionen nicht nur für Harnstoff,⁴⁾ sondern auch für Ornithin stark von

¹⁾ K. Shiga, Diese Zeitschrift, 1904. Bd. 42, S. 505; K. Shibata, l. c.; T. Takeuchi, l. c.

²⁾ l. c.

³⁾ Diese Zeitschrift, 1904, Bd. 42, S. 502.

⁴⁾ Die geringe Menge des Harnstoffstickstoffs wird von Shiga mit

den theoretischen Werten zurück, wie folgende kurze Berechnung uns zeigt.

Stickstoff in g	Gefunden	Theorie	Gefunden	Theorie
des zugesetzten Arginins	0,138	—	0,138	—
» unzersetzten »	0,028	—	0,035	—
» zersetzten »	0,110	—	0,103	—
» Ornithins aus Arginin	0,012	0,055	0,027	0,051
» Harnstoffs »	0,042	0,055	0,022	0,051

Eine Erklärung dieser Ergebnisse soll in den unten angeführten Versuchen gegeben werden (s. S. 186).

Für höhere Pflanzen wurde eine fermentative Argininspaltung von A. Kiesel¹⁾ nachgewiesen. Als Material diente Preßsaft grüner 2wöchentlicher Keimpflanzen von *Lupinus luteus*. Die entstandenen Produkte wurden dabei nicht untersucht.

Die im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit näher beschriebenen Versuche konnten, mit Berücksichtigung der oben besprochenen Möglichkeiten und Tatsachen, uns ein folgendes Bild über den fermentativen Argininabbau in Pflanzen geben.

Der wohl allgemein verlaufende Vorgang der Argininspaltung in Pflanzen ist derselbe, welcher auch in tierischen Organen und bei Fäulnis nachgewiesen ist: das Arginin zerfällt, wenn nicht quantitativ, so doch zum größten Teil in Ornithin und Harnstoff.

Es konnte bei nachgewiesenem starkem Argininabbau weder Guanidin noch Agmatin nachgewiesen werden.

Das Fehlen des Guanidins durch dessen weiteren Abbau zu erklären, ist man nicht berechtigt, da bis jetzt noch keine fermentative Spaltung desselben aufgefunden werden konnte; auch wurde dieses negative Verhalten des Guanidins gegen

einer Verweisung auf die Arbeit von F. Kutscher und J. Otori (Zentralblatt für Physiologie, Bd. 18 [1904], S. 249) dadurch erklärt, daß der Harnstoff teilweise bei dem Silberbarytverfahren gefällt wird.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 60 (1909), S. 460.

Fermentwirkung von Pflanzenmaterial durch einen Versuch nachgeprüft. Also konnte Guanidin nicht gebildet worden sein.

Unter anderen Bedingungen, vielleicht auch auf nicht direkt fermentativem Wege oder wahrscheinlich unter Einwirkung von besonderen Oxydasen, könnte dennoch Guanidin entstehen; die zu diesem Vorgang nötige Oxydasewirkung konnte in den ausgeführten Versuchen nicht stattgefunden haben, vielleicht weil das Ferment durch irgendwelche Stoffe geschädigt war. Wenigstens muß aber das Arginin als die Stammsubstanz des Guanidins angesehen werden, bis keine andere aufgefunden ist.¹⁾

Die Frage, ob das Agmatin überhaupt nicht gebildet war oder aber möglicherweise doch entstanden und dann abgebaut sein konnte, wird noch nachgeprüft werden. Die Resultate sollen dann veröffentlicht werden.

Da der Prozeß der Agmatinbildung aus Arginin durch Kohlensäureaustritt sehr an die typischen bakteriellen Prozesse erinnert, so wäre vielleicht anzunehmen, daß das Agmatin auch ein ständiges Fäulnisprodukt des Arginins ist und dabei wahrscheinlich auf fermentativem Wege, durch ein spezifisches bakterielles Ferment, gebildet wird. Es wäre sehr wünschenswert, nachzuprüfen, ob dieses wirklich der Fall ist.

Es gelang nicht, Agmatin bei der Hydrolyse von Weizenkeimen nachzuweisen; somit war es nicht in dem Weizenkeimeiweiß vorgebildet und konnte auch nicht in freiem Zustande in den Weizenkeimen vorhanden gewesen sein.

Ebenfalls gelang es auch nicht, das Agmatin bei Autolyse von Hefe aufzufinden. Es entsteht also nicht in derselben bei dem genannten Vorgange. Es konnte freilich möglich sein, daß der Agmatinkomplex bei der Autolyse im Eiweiß der Hefe gebildet worden war, jedoch wurde das rückständige Eiweiß nicht untersucht.

¹⁾ J. Otori fand bei der Hydrolyse von Pseudomucin Guanidin und nimmt zur Erklärung dieser Tatsache einen besonderen Guanidinkern im untersuchten Eiweißkörper an (Diese Zeitschr., Bd. 42 [1904], S. 458; Bd. 43, S. 77). Die Menge des gefundenen Guanidins betrug 0,0250 bis 0,0393 % des Eiweißes.

Daß das Ornithin bis jetzt in Pflanzen nicht aufgefunden worden ist, beruht nicht auf dem schnellen weiteren Abbau des gebildeten Ornithins — ein derartiger Abbau konnte nicht nachgewiesen werden —, sondern wahrscheinlich auf dem Entschlüpfen des Ornithins bei den Phosphorwolframsäurefällungen.

Die nötigen Bedingungen zum Auffinden des Ornithins sollen in einer nächsten Abhandlung besprochen werden.

Außerdem muß noch darauf aufmerksam gemacht werden, daß das Ornithin bei geringen Mengen weder durch die Benzoylverbindung, noch durch das Chloroplatinat nachgewiesen werden kann, wenn es nicht vollkommen rein ist.

Wenn die fermentative Spaltung des Ornithins nicht nachgewiesen werden konnte und somit die Bildung von Putrescin aus diesem Stoffe ausgeschlossen war, so war es doch vielleicht möglich, daß eine Bildung des Putrescins über das Agmatin oder eine direkte Bildung von Putrescin aus Arginin stattfindet.

Jedoch konnte kein Putrescin als Spaltungsprodukt des Arginins aufgefunden werden.

Die Vermutung, daß das Putrescin vielleicht weiter gespalten war, konnte nicht nachgeprüft werden, da bisher keine Methode zur quantitativen Bestimmung von Putrescin neben Ammoniak ausgearbeitet ist.

Somit war die Beteiligung des Putrescins beim Argininabbau unter den vorhandenen Bedingungen möglich, aber nicht nachweisbar.

Wenn der Harnstoff nur in einem Falle in Pflanzen aufgefunden worden ist, muß dennoch seine Entstehung als ein sehr verbreiteter Vorgang angesehen werden.

Seine Abwesenheit in den bisher untersuchten Pflanzenobjekten ist dadurch zu erklären, daß die Pflanzen ein ihn spaltendes Ferment enthalten und daß dadurch der Harnstoff entweder gleich nach seiner Bildung zersetzt wurde, oder, wenn vielleicht Harnstoff und Urease in verschiedenen Zellen enthalten waren, die Einwirkung der letzteren erst nach dem zu der Untersuchung nötigen Zerkleinern begann.

Jedoch gibt es Pflanzen, die keine oder fast keine Urease

enthalten und in diesen Pflanzen muß Harnstoff gefunden werden, wenn auch vielleicht in viel kleineren Mengen, als bei *Lycoperdon bovista* (bis 3,5% der Trockensubstanz). Um also mit einer gewissen Sicherheit die Gegenwart oder Abwesenheit des Harnstoffes in Pflanzen festzustellen, muß man das Material zunächst auf Urease untersuchen und nur dasjenige zur Untersuchung verwenden, welches Spuren oder keine Urease enthält.

Die höheren Pflanzen scheinen oft ein viel größeres Vermögen zur Harnstoffspaltung zu besitzen, als die sogenannten Harnstoffvergärer, welche bis 46% des zugesetzten Harnstoffs spalten können.¹⁾ Für Weizenkeime konnte ich eine Spaltung bis 91% nachweisen.²⁾

Auch zeigen die von mir ausgeführten Versuche, daß das Vermögen der Harnstoffspaltung bei Pilzen augenscheinlich geringer ist, als bei manchen höheren Pflanzen.

Die Urease gehört zur Gruppe der desamidierenden Fermente und hat augenscheinlich einen sehr speziellen Wirkungskreis. Vielleicht ist dieses auch der Fall bei anderen desamidierenden Fermenten. Bei nachgewiesenem starken Harnstoffzerfall in einem pflanzlichen Objekt kann es vorkommen, wie es z. B. in den Versuchen mit blauen Lupinen gefunden wurde, daß in demselben keine anderen Substanzen desamidiert werden. Es ist begreiflich, daß gerade aus solchen Objekten reinere Ureasepräparate erhalten werden können.

Der fermentative Prozeß Harnstoff \rightarrow kohlen-saures Ammoniak konnte nicht als reversibel nachgewiesen werden, d. h. es konnte kein Harnstoff bei Einwirkung von Urease auf kohlen-saures Ammoniak erhalten werden. Somit kann Urease nicht als ein harnstoffbildendes Ferment angesehen werden.

¹⁾ H. Euler, Grundlagen und Ergebnisse d. Pfl.-Chemie, Bd. 2, S. 203 (1909).

²⁾ Nach den von T. Takeuchi (l. c.) angegebenen Zahlen berechnet sich die Harnstoffspaltung durch Samenmaterial von *Glycine hispida* forma sogar bis 95%. Bei Zusatz von 0,5 g Harnstoff wurde nach 24 Stunden 0,2713 g Ammoniak erhalten. Jedoch fehlt bei dem genannten Autor die Angabe über die Menge des aus dem Pflanzenmaterial selbst gebildeten Ammoniaks, so daß dieselbe bei dieser Berechnung nicht abgezogen werden konnte.

Es wurde die eigentümliche Merkwürdigkeit beobachtet, daß bei Versuchen mit Arginin durch sukzessive Einwirkung von Arginase und Urease viel weniger Ammoniak abgespalten wurde, als zu erwarten war. Dieses Resultat kann ich nicht erklären.

Experimenteller Teil.

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, sowohl den fermentativen Argininabbau in Pflanzen nachzuweisen, als auch die dabei entstandenen Produkte und deren weitere Veränderungen zu untersuchen.

In den Versuchen, wo die Pflanzenobjekte auf die Anwesenheit von Fermenten geprüft werden sollten, wurde direkt Pflanzenbrei verwendet, der durch möglichst feines Zerreiben der Objekte im Porzellanmörser zuerst mit grobem, dann mit feinem Quarzsand unter Zusatz von etwas Wasser erhalten wurde.

Der mit etwas Wasser in das betreffende Versuchsgefäß gespülte Brei wurde mit einer Lösung der zu untersuchenden Substanz versetzt, als Antiseptikum zu kleineren Versuchen Toluol (5—15 ccm), zu größeren Toluol und Chloroform genommen und nach starkem Umrühren in einen Brutschrank (37—38°) gebracht. In diesem wurde bei länger dauernden Versuchen das Umrühren von Zeit zu Zeit wiederholt und etwas Toluol nachgefüllt.

Wo es sich nicht um das Auffangen des gebildeten Ammoniaks handelte, wurden ca. 500 ccm Erlenmeyer-Kolben oder bei großen Versuchen eine entsprechende Flasche gebraucht, die, um einen starken Gasdruck zu vermeiden, nur leicht mit einem Korkstopfen geschlossen wurden.

Wenn jedoch eine Ammoniakbestimmung nach dem Versuche beabsichtigt war, wurde die Mischung in einer 1—2 l fassenden Saugflasche gemacht, die in Verbindung mit einem das Ammoniak auffangendem, mit $\frac{1}{2}$ -n-Schwefelsäure versehenem Gefäß stand, welches durch eine kleine Peligotsche Röhre mit konzentrierter Schwefelsäure abgeschlossen war. Nach dem Versuch wurde durch einen schon vorher angebrachten Tropftrichter eine Aufschwemmung von Magnesiumoxyd in die Versuchsflüssigkeit hineingebracht und das so frei gemachte Am-

moniak im Vakuum nach Nencki und Zaleski¹⁾ abdestilliert, wobei in den Kugelrezipienten die Schwefelsäure aus dem abschließenden Gefäße umgefüllt wurde. Zur Sicherheit wurden immer 2 solche Rezipienten und eine Waschflasche eingeschaltet, letztere, um die leicht beim Öffnen der Apparatur überspritzende Flüssigkeit aufzufangen.

In den Versuchen, wo quantitative Stickstoff- oder Ammoniakbestimmungen ausgeführt werden sollten, wurde gleichzeitig eine Kontrollportion unter Weglassen der zu prüfenden Substanz angesetzt, um den schon im Material befindlichen Stickstoff oder Ammoniak zu bestimmen.

Wenn eine Base zur Untersuchung kam, wurde eine ihr entsprechende Menge Natriumcarbonat in die Kontrollportion zugesetzt. Sonst wurden in der Kontrollportion alle Bedingungen gleich gehalten.

Die Stickstoff- und Ammoniakzahlen der Kontrollportionen kamen dann bei den Berechnungen in Abzug.

I. Versuche mit Arginin.

Zuerst wurde eine Reihe von Versuchen unter Zusatz von ca. 0,7 g Arginincarbonat ausgeführt, wobei der nicht durch Phosphorwolframsäure fällbare und aus dem Arginin stammende Stickstoff in einem Teile des Filtrats bestimmt wurde.

Die Versuchsdauer war ca. 24 stündig, außer dem Versuche mit Trüffeln, wo die fermentative Einwirkung 97 Stunden dauerte. Die ganze Menge des bei den Versuchen zugesetzten Wassers betrug 130 ccm. Das zu den Versuchen verwendete Arginincarbonat war teilweise aus Edestin, teilweise aus Buchweizen-eiweiß dargestellt. Die zugesetzte Arginincarbonatmenge wurde bei allen Versuchen durch eine in einem Teile der Lösung ausgeführte Stickstoffbestimmung kontrolliert.

Die erhaltenen Resultate sind in der Tabelle I zusammengestellt und wurden durch folgendes Verfahren erhalten.

Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde 50%ige Schwefelsäure bis zu einer Konzentration von 5 Volumprozent in der

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 33, S. 193 (1901).

Tabelle I.

Objekt	Gewicht desselben in g	Verwechslungs- dauer in Stunden	Arginin- carbonat in g bonat zu- gesetzt	Arginin- pikrat in g zu- rück- gewon- nen	Zer- setzungs- punkt desselben in ° C.	Arginin- carbonat (berechnet)		Orni- thin ge- fun- den	Harn- stoff ge- fun- den	Stickstoffmenge		Abgespalten u. nicht fäll- bar durch Phosphor- wolframsäure in g	in der Harn- stoff- gruppe des Argi- nins in g	in % des Argi- nin- stick- stoffs	Analytische Belege für $\frac{2}{3}$ des Filtrats vom PW- Niederschlag	N- Menge $\frac{1}{100}$ n- NaOH nach ent- sprech. Kjel- dahl in g	
						unver- ändert in g	zer- setzt in g			in %	in g						
Weisse Lupinen, etioliert, 18tägig	10	—	0,6613	0,2709	206	0,1265	0,5348	80,9	0	0	0,1809	0,0904	0,0623	34,4	—	32,40	0,04536
Weizen- keime	—	5	0,7528	0,0188	nicht bestimmt	0,0090	0,7438	98,8	0	0	0,2059	0,1029	0,1275	61,9	—	50,75	0,07125
Cham- pignon	10	—	0,7265	0,3998	207,5	0,1868	0,5397	74,3	0	+	0,1987	0,0993	0,0903	45,4	—	37,00	0,05180
Blaue Lupinen, etioliert, 12tägig	10	—	0,8175	0,8378	207,5	0,3914	0,4261	52,1	0	0	0,2236	0,1118	0,0622	27,8	—	28,01	0,03921
Trüffel	10	—	0,7058	0,3873	207,5	0,1809	0,5249	74,4	0	nicht ge- sucht	0,1930	0,0965	0,0632	32,7	—	25,29	0,03551
	10	—	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7,30	0,01025	

gesamten Flüssigkeit zugesetzt und die basischen Substanzen, ohne Filtrieren, mit den Eiweißkörpern zusammen mit Phosphorwolframsäure möglichst quantitativ ausgefällt, wobei ein Überschuß sorgfältig vermieden wurde. Nach 48—64 stündigem Stehen wurden die Flüssigkeiten samt Niederschlag mit 5%iger Schwefelsäure bei 250 ccm aufgefüllt, wobei das Toluol entfernt wurde. Nach dem Auffüllen wurde der Niederschlag abfiltriert und in 100 ccm des Filtrats eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl gemacht.

In allen Versuchen konnte auf Grund dieser in der Versuchs- und Kontrollportion ausgeführten Stickstoffbestimmungen ein mehr oder weniger energischer Argininabbau nachgewiesen werden.

Dann wurde die Phosphorwolframsäurefällung der Versuchsportion nach Auswaschen mit 5%iger Schwefelsäure auf die in ihr enthaltenen Substanzen untersucht. Sie wurde in 75% Aceton¹⁾ aufgeschwemmt, mit Baryumhydrat die Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure und mit Kohlensäure das überschüssige Baryt entfernt. Nach Ansäuern der eingeeengten Flüssigkeit mit Salpetersäure resp. Schwefelsäure²⁾ wurden die stets in nur sehr geringer Menge vorhandenen Nucleinbasen durch Silbernitrat resp. Silbersulfat entfernt und in üblicher Weise³⁾ die drei Histidin-, Arginin- und Ornithinfraktionen erhalten. Jedoch wurde erstere nur in dem Versuch mit weißen Lupinen abgetrennt, da sich die Abtrennung dieser Fraktion für unnötig erwies und unterlassen werden konnte. Das Filtrat von den Nucleinbasen gab nämlich in keinem der Versuche eine Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung und auch die Prüfung mit Diazobenzosulfosäure erwies sich überall negativ. Bei den weißen Lupinen konnte aus der Histidinfraktion nur eine sehr geringe Spur Substanz als Pikrat erhalten werden.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 68 (1910), S. 167.

²⁾ Schwefelsäure und Silbersulfat wurden in den Versuchen mit blauen Lupinen und Trüffeln angewendet.

³⁾ A. Kossel und H. Pringle, Diese Zeitschrift, Bd. 49 (1906), S. 318.

Die in der Argininfraktion enthaltenen Basen wurden in Carbonate übergeführt und mit Pikrinsäure neutralisiert. In allen Versuchen konnte aber nur Argininpikrat nachgewiesen werden; der Zersetzungspunkt stimmte mit dem für Argininpikrat angegebenen überein,¹⁾ war sogar gewöhnlich etwas höher (207—208° uncorr.). Ein Umkrystallisieren war meistens sogar nicht nötig und änderte den Zersetzungspunkt nicht.

Die von dem ausgeschiedenen und nach Trocknen gewogenen Argininpikrat²⁾ erhaltene Mutterlauge war sehr gering und enthielt in allen Versuchen nur sehr wenig Substanz; augenscheinlich bestand sie aus dem in Lösung gebliebenen und nur schwach verunreinigten Argininpikrat.

Somit konnte weder Guanidin, noch Agmatin in diesen Versuchen gebildet worden sein, da beide sehr schwer lösliche Pikrate geben.

Bei der Verarbeitung der Ornithinfraktionen mußte in den Versuchen, wo salpetersaures Silber zum Ausfällen der Argininfraktion verwendet wurde (s. Anm. 2, S. 181), eine nochmalige Fällung mit Phosphorwolframsäure unternommen werden, wogegen in den anderen, wo Silbersulfat gebraucht wurde, diese Fällung nicht vorgenommen zu werden brauchte. In beiden Fällen wurden die in der Ornithinfraktion vorhandenen Basen in üblicher Weise in Carbonate übergeführt, wobei die erhaltenen Substanzmengen sehr gering waren.

In den Versuchen mit weißen Lupinen, Weizenkeimen und Champignons wurde versucht, daraus eine Benzoylverbindung (Ornithursäure) zu erhalten. Doch blieben in allen drei Versuchen die Bestrebungen erfolglos — es konnte keine in Äther unlösliche Verbindung erhalten werden.

In den Versuchen mit blauen Lupinen und Trüffeln wurde versucht, ein Chloroplatinat zu erhalten, doch wurden keine krystallisierbaren Substanzen erhalten — die Menge erstarrte im Vakuumexsikkator (mit etwas Kochsalz in der Schwefelsäure) zu einem durchscheinenden braunen Sirup.

¹⁾ O. Riesser, Diese Zeitschrift, Bd. 49 (1906), S. 216.

²⁾ In der Tabelle I sind die Pikratmengen auch in die entsprechenden Carbonatmengen umgerechnet.

Somit konnten in diesen Versuchen keine faßbaren basischen Substanzen nachgewiesen werden, die dem Arginin entstammen mußten.

Die von der Stickstoffbestimmung übriggebliebene Menge des Filtrats vom Phosphorwolframsäureniederschlag samt Waschflüssigkeiten wurden im Versuche mit Trüffeln auch auf Basen verarbeitet. Es wurde versucht, die der Fällung möglicherweise entschlüpften Basen hier als Chloroplatinate nachzuweisen: jedoch gelang es auch hier nicht, eine krystallinische Verbindung zu erhalten.

Somit mußten die in den Versuchen vorhandenen Mengen der Basen, die sich wohl teilweise in der Phosphorwolframsäurefällung, teilweise im Filtrat von derselben befanden, wenigstens bei getrennter Behandlung der beiden Fraktionen, zu gering sein, um als Benzoylverbindungen oder Chloroplatinate nachgewiesen werden zu können.

Daß in diesen Versuchen dennoch Ornithin gebildet sein mußte, beweist ein später zu besprechender Versuch mit einer größeren Argininmenge.

In den anderen Versuchen wurde das übriggebliebene Filtrat von der Fällung mit Phosphorwolframsäure auf Harnstoff verarbeitet.

Die auf Harnstoff zu prüfenden Flüssigkeiten wurden mit Baryt von der Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure befreit und der überschüssige Baryt mit Kohlensäure entfernt. Der Rückstand der zur Trockne abgedampften Flüssigkeit wurde mit absolutem Alkohol extrahiert und die Prozedur des Eindampfens und Aufnehmens 1—2 mal wiederholt. In der so erhaltenen alkohollöslichen Harnstofffraktion wurde der Alkohol entfernt und versucht, den Harnstoff als salpetersaures Salz zu isolieren und zu identifizieren.

Jedoch gelang es, von den vier Versuchen, wo auf Harnstoff geprüft wurde,¹⁾ nur in dem einen Versuche mit Champignons Harnstoff nachzuweisen. Die hier gefundenen Krystalle

¹⁾ In dem Versuch mit Trüffeln wurde der Rest des Filtrats, wie schon angegeben, zum Nachweis von Basen verwendet.

des salpetersauren Harnstoffs wurden durch eine Winkelmessung identifiziert.

Wie aus den folgenden Versuchen mit Zusatz von Harnstoff zu ersehen ist, entspricht dieser Befund vollkommen den dort erhaltenen Resultaten — Harnstoff wurde gerade im Versuche mit der Pflanze gefunden, in der keine oder fast keine Urease tätig gewesen war, wo also der aus dem Arginin entstandene Harnstoff nicht weiter zerstört werden konnte.

Daraus konnte also mit großer Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, daß bei der Argininspaltung Harnstoff auch in den anderen untersuchten Objekten gebildet war, aber durch die doch kräftig wirkende Urease weiter zerstört wurde.

Da Harnstoff somit als ein fermentatives Spaltungsprodukt des Arginins in Pflanzen angesehen werden mußte, mußte zugleich eine notwendige, wenn auch vielleicht nur vorübergehende Bildung von Ornithin angenommen werden.

II. Versuch mit Ornithin.

Um festzustellen, ob das Ornithin durch fermentative Einwirkung von Pflanzenmaterial angegriffen wird und dadurch das Nichtauffinden desselben zu erklären ist, wurde ein Versuch mit Weizenkeimen unter Ornithinzusatz angestellt.

Das Ornithin, welches aus 4,1 g Arginincarbonat durch Einwirkung von Leberbrei dargestellt wurde,¹⁾ wurde als Carbonat in den Versuch eingeführt.

Der erhaltene Sirup des kohlsauren Ornithins wurde in 100 ccm Wasser gelöst und je 50 ccm der Lösung mit 5 g Weizenkeimbrei und 5 ccm Toluol versetzt. In einer Portion wurden im Brei vor dem Zusetzen die Fermente durch 10 Minuten dauerndes Erhitzen im kochenden Wasserbade abgetötet. Nach Auffüllen der beiden Portionen mit Wasser bis 100 ccm kamen sie in den Brutschrank, wo sie 232 Stunden verblieben.

Beim Abschluß des Versuchs konnte nur eine schwache Bläuung des roten Lackmuspapiers, welches in den Kölbchen aufgehängt war, bemerkt werden, jedoch war die Bläuung in

¹⁾ Die Ausbeute bei dieser Darstellung ist öfters gering, da vermutlich in der Leber ein Ornithin spaltendes Ferment enthalten ist.

der Versuchsportion viel deutlicher. Es mußte also irgendwelche Desamidation stattgefunden haben.

Nach der Abtrennung des Eiweißes durch Aufkochen nach Ansäuern mit Essigsäure und nach starkem Einengen der erhaltenen Flüssigkeiten wurden dieselben mit Schwefelsäure bis zum Gehalt von 5% versetzt und dann die Fällung mit Phosphorwolframsäure sehr sorgfältig vorgenommen: das Reagens wurde portionenweise zugesetzt und jeder Niederschlag nach längerem Stehen abgenutscht. Erst nachdem das Filtrat nach längerem Stehen keinen Niederschlag mehr gab, wurde die Fällung als abgeschlossen angesehen. Die zum Auswaschen der Niederschläge verwendete Säure wurde ebenso, nur getrennt behandelt.

Die weitere Behandlung der vereinigten Niederschläge war die übliche, wobei Silbersulfat angewendet wurde.

Es wurden nur die erhaltenen Ornithinfraktionen untersucht, in denen das Ornithin als Chloroplatinat ausgeschieden wurde. Die Menge der erhaltenen Platinate differierte verhältnismäßig nur sehr wenig.

Kontrollportion	1,267 g	Chloroplatinat	
Versuchsportion	0,995	»	»
Differenz	0,272	»	entsprechend

0,066 g Ornithin.

Somit konnte eine nur sehr schwache oder vielleicht auch keine Ornithinzersetzung stattgefunden haben, denn die Ausscheidung des Chloroplatinats aus der Versuchsportion war mit mehr Verlusten verknüpft, wie auch wegen der während der Versuchsdauer vorgegangenen Autolyse zu erwarten war.

Die Ursache für den negativen Ausfall des Ornithinnachweises in den in Tabelle I zusammengestellten Versuchen war also nicht die weitere Zersetzung dieser Base. Vielmehr ist anzunehmen, daß es dem Nachweis entging, weil seine Menge zu gering war.

Dieser Versuch veranlaßt, hier auf eine Beobachtung aufmerksam zu machen, die bei der Darstellung von Ornithin aus Arginin durch Einwirkung von Leberarginase gemacht wurde. Im Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag wurde näm-

lich eine nicht unbeträchtliche Menge von Ornithin gefunden, die aus sehr konzentrierter Lösung nochmals mit Phosphorwolframsäure gefällt und als Chloroplatinat ausgeschieden wurde. Die Menge betrug gegen 0,4 g Chloroplatinat.

Es mußte also bei jeder ausgeführten Fällung mit Phosphorwolframsäure ein ziemlich großer Teil des Ornithins derselben entweichen, was überhaupt besonders da zu beachten ist, wo die anwesende Ornithinmenge klein, oder die zu verarbeitende Lösung wenig konzentriert ist.

Wenn wir jetzt noch einmal zu den in der Tabelle I zusammengestellten Versuchen zurückblicken, so werden uns durch dieses Entweichen die großen Zahlen der im Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag ausgeführten Stickstoffbestimmungen erklärt, besonders, da das aus dem Harnstoff gebildete Ammoniak¹⁾ wenigstens zum Teil noch im Phosphorwolframsäureniederschlag sein mußte und dennoch die Zahlen sehr hoch waren; besonders muß auf den Versuch mit Weizenkeimen verwiesen werden (61,9% Stickstoff des Arginins im Filtrate).

Da die Ornithinspaltung jedenfalls, wenn überhaupt, sehr gering sein mußte, können diese hohen Zahlen kaum durch dessen Zersetzung erklärt werden.

Ebenso sind in den schon besprochenen Versuchen von Shiga die zu niedrig gefundenen Ornithinstickstoffzahlen zu erklären (s. S. 174).

Auch würde das bisherige Nichtauffinden von Ornithin²⁾ in Pflanzen eine gleiche Erklärung durch die angeführten Tatsachen finden.

Offenbar ist man häufig in folgender Weise verfahren: man hat nach nur mäßigem Eindampfen der Pflanzenextrakte mit Phosphorwolframsäure die Basen gefällt, die Flüssigkeiten nicht genügend lange nach der Fällung stehen gelassen, das Filtrat von den Fällungen nicht mit immer neuen Mengen Phosphorwolframsäure versetzt. Auf diese Weise können negative

¹⁾ S. unten, Versuche mit Harnstoff.

²⁾ E. Schulze, Diese Zeitschrift, Bd. 47, S. 507 (1906).

Resultate erhalten werden, trotzdem beträchtliche Mengen Ornithin im Material vorhanden sind.

III. Versuch mit Arginin.

Um das Ornithin bei Argininabbau sicher nachweisen zu können, mußte also eine größere Menge von kohlensaurem Arginin genommen werden als in den früheren Versuchen, in denen die Bildung von Ornithin nur gefolgert werden konnte.

Als Material wurden Weizenkeime gewählt, da dieselben unter den untersuchten Objekten die größte Menge eines argininabbauenden Fermentes enthielten. Es wurden 20 g derselben genommen, 4,68 g Arginincarbonat in wässriger Lösung, 20 ccm Toluol und 5 ccm Chloroform hinzugefügt. Im ganzen wurden 450 ccm Wasser genommen.

Schon nach sehr kurzer Zeit konnte ein über der Flüssigkeit angebrachtes, befeuchtetes, rotes Lackmuspapier eine Blaufärbung aufweisen, was auf die Bildung von Ammoniak hinweist, welches vielleicht schon aus dem entstandenen und dann gespaltenen Harnstoff stammte. Der Versuch dauerte 8 Tage.

Die Verarbeitung war die gleiche, wie in den früheren Versuchen, wobei das unzersetzte Arginin mit Silbersulfat und Baryt ausgeschieden wurde. In dieser Fraktion konnte auch außer dem Arginin keine andere Substanz nachgewiesen werden.

Das Arginin wurde als Pikrat identifiziert. Zersetzungspunkt 206°.

Das Pikrat wog 2,0439 g, entsprechend 0,955 g Arginincarbonat.

Zersetzt waren also 3,725 g oder 79,6% des zugefügten Arginincarbonats.

Bei der Fällung mit Phosphorwolframsäure nach dem Abschluß des Versuches wurde sehr darauf geachtet, dieselbe in einer möglichst geringen Flüssigkeitsmenge auszuführen. Das Ausfällen wurde wie im Versuch mit Ornithin ausgeführt.

Das behufs Gewinnung des Chloroplatinats zuerst dargestellte Ornithinchlorid krystallisierte vollständig in einigen Minuten aus, was auf die Reinheit der Substanz hinweist.

Ornithinchloroplatinat wurde im Gewichte von 5,2281 g erhalten, was 1,275 g Ornithin entspricht.

Aus der gespaltenen Arginincarbonatmenge mußte jedoch nach Berechnung 2,399 g Ornithin erhalten werden.

Die erhaltene Ornithinmenge blieb also sehr stark von der durch die Gleichung $\text{NH}_2\text{C}(\text{NH})\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} = (\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ geforderten zurück.

Nach Umkrystallisieren des Ornithinchloroplatinats wurde zum Identifizieren der Zersetzungspunkt bestimmt und eine Platinbestimmung gemacht, wobei folgende Werte erhalten wurden.

Zersetzungspunkt 202°. Nach einer mündlichen Mitteilung von Herrn Dr. F. Weiss liegt der Zersetzungspunkt analysenreiner Präparate bei 200–210°.

0,2855 g des Chloroplatinats gaben 0,1020 g Pt.

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2 \text{HCl} \cdot \text{PtCl}_4$:

Pt = 35,96%

Gefunden:

35,73%

Das Filtrat von dem Phosphorwolframsäureniederschlag wurde auf Harnstoff wie früher verarbeitet. Es konnte aber kein Harnstoff als Nitrat nachgewiesen werden, d. h. der Harnstoff mußte durch Urease vollständig oder zum größten Teile zersetzt gewesen sein.

Der in Alkohol nicht lösliche Teil dieses Filtrats wurde nicht weiter untersucht, konnte aber einen Teil des Ornithins enthalten.

IV. Versuche mit Harnstoff.

In den beschriebenen Versuchen mit Arginincarbonat, wo Harnstoff gebildet worden sein mußte, konnte nur in einem Falle, bei Champignons, Harnstoff aufgefunden werden.

Es war daher zu erwarten, daß in allen Fällen, wo der Harnstoff fehlte, Urease vorhanden sein mußte und wo er war, dagegen letztere fehlen mußte. Diese Schlußfolgerung fand eine vollständige Bestätigung in den ausgeführten Versuchen.

Zuerst wurden Versuche angestellt, wobei ich mich bemühte, den unzersetzten Harnstoff zurückzugewinnen und durch Wägung zu bestimmen; die ihm beigemengten anderen Substanzen sollten durch entsprechende Kontrollversuche eliminiert werden.

Die Versuchsanstellung war die übliche. Nach dem Abschluß des Versuchs wurde das Eiweiß durch Aufkochen ausgeschieden, auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und ein aliquoter Teil des Filtrats unter Zusatz von BaCO_3 zum Sirup eingedampft und dann mit Alkohol aufgenommen. Die Prozedur des Eindampfens und Aufnehmens in Alkohol wurde mehrmals wiederholt, um den «Harnstoff» möglichst rein zu bekommen, und nach Trocknen im Vakuumexsikkator gewogen.

Jedoch erwies sich diese Methode zu quantitativen Bestimmungen ungeeignet, und die nähere Beschreibung der Resultate der Wägungen kann deshalb weggelassen werden: das aus dem Harnstoff stammende Ammoniak übte einen starken Einfluß auf die Autolyse des Pflanzenmaterials aus und deshalb wurden die Kontrollversuche ohne Harnstoff mit den eigentlichen Versuchen mit Harnstoff unvergleichbar.

Von den in dieser Art mit etiolierten Keimpflanzen von blauen Lupinen verschiedenen Alters und mit Weizenkeimen ausgeführten Versuchen trat die Ammoniakwirkung besonders bei letzteren hervor, da bei Zusatz von Harnstoff für die «Harnstofffraktion» in der Versuchsportion ein kleineres Gewicht erhalten wurde, als ohne dessen Zusatz in der Kontrollportion, was die beabsichtigte Berechnung der Zersetzung von Harnstoff sogar unmöglich machte (s. Tabelle II).

In den Versuchsportionen wurde die Reaktion der Flüssigkeit sehr rasch alkalisch und es konnte mit Lackmuspapier starke Ammoniakausscheidung nachgewiesen werden.

Nach Zusatz von etwas Wasser und Salpetersäure zu den erhaltenen «Harnstofffraktionen» wurde in den Versuchsportionen nur sehr wenig oder gar kein salpetersaurer Harnstoff erhalten, wogegen in den Kontrollportionen, wo Harnstoff zu dem erhitzten und abgetöteten Brei zugesetzt wurde, eine sehr große Menge von dieser Harnstoffverbindung ausgeschieden wurde.

Jedenfalls erwiesen diese Versuche ganz unzweideutig, daß in allen Fällen Urease vorhanden war, nur konnte das Ausmaß der Harnstoffzersetzung nicht bestimmt werden.

Durch eine gleiche Versuchsanstellung konnte aber für

Tabelle II.

Objekt	Gewicht in g		Ver- suchs- dauer in Std.	Harn- stoff zuge- setzt in g	Gewicht der «Harn- stoff- fraktion» in g	Re- aktion	Harnstoff als Nitrat
	frisch	trocken					
Blaue Lupinen, etioliert							
14 tägig	10	—	41	1,1567	0,8536	alkalisch	+
24 »	20	—	72	0,7980	0,8605	»	wenig
24 » abgetötet	20	—	72	0,7980	1,0280	sauer	viel
30 »	20	—	120	1,3381	1,3817	alkalisch	wenig
30 »	20	—	120	0	0,1835	sauer	—
30 » abgetötet	20	—	120	1,3381	1,5164	»	viel
30 »	20	—	120	0	0,1360	»	—
Weizenkeime	—	10	72	1,0898	0,8958	alkalisch	nicht nach- weisbar
»	—	10	72	0	1,4388	sauer	—
» abgetötet	—	10	72	1,0898	1,4552	»	viel
»	—	10	72	0	0,4022	»	—
Preßhefe	20	—	144	0,9435	1,2721	»	viel
»	20	—	144	0	0,1960	»	—

Hefe die Abwesenheit von Urease nachgewiesen werden. Neben der Versuchsportion mit Harnstoff wurde eine Kontrollportion ohne Harnstoff aufgesellt. Die Differenz der Gewichte der «Harnstofffraktionen» war fast gleich dem Gewicht des zugesetzten Harnstoffs:

Zugesetzt 0,9435 g Harnstoff

Unzersetzt (berechnet) 1,0761 g »

Ein in den Versuchskolbchen aufgehängtes rotes Lackmuspapier veränderte seine Farbe in beiden Fällen nicht; auch war die Reaktion der Flüssigkeit in beiden Fällen sauer geblieben.

Da es also durch Wägung des unzersetzten Harnstoffs nicht gelang, eine Vorstellung über die Größe der Harnstoffzersetzung zu erlangen, wurde dieselbe durch Messung des gebildeten Ammoniaks bestimmt, wobei die schon beschriebene Einrichtung benützt wurde. Die erhaltenen Resultate sind in der Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III.

Objekt	Gewicht in g		Ver- suchs- dauer in Std.	Harnstoff in g		Harn- stoff zer- setzt in %	Am- moniak in g abge- spalten	Stick- stoff des- selben in g	Stickstoff- gehalt im zuge- setzten Harnstoff in g	Reaktion nach dem Versuch	Dauer der Va- kuum- destil- lation in Std.	cem $\frac{1}{100}$ - Natron- lauge, ent- sprechend dem NH_3
	frisch	trocken		zuge- setzt	zersetzt (berechnet)							
Weizenkeime, tot . . .	—	10	20,5	0,6218	—	—	0,0016	0,0013	0,2908	schw. sauer	4	0,95
Weizenkeime	—	10	48,5	0,6788	0,1991	29,33	0,1267	0,1042	0,3174	alkalisch	13	74,20
„	—	10	48,5	0			0,0135	0,0111	0	schw. sauer	8	7,90
„ 1)	—	10	70	0,6276	0,4334	69,06	0,2622	0,2156	0,2935	alkalisch	11	153,6
„	—	10	64,5	0			0,0157	0,0129	0	schw. sauer	8,5	9,20
„ 1)	—	15	258	0,6388	0,5855	91,66	0,3854	0,3170	0,2987	alkalisch	12	225,80
„	—	15	259	0			0,0525	0,0432	0	schw. sauer	8	30,75
Preßhefe	20	—	63,5	0,6688	0,0264	3,95	0,0298	0,0245	0,3128	„	9	17,45
„	20	—	70	0			0,0148	0,0122	0	„	4	8,65
Trüffel	10	—	48,5	0,6171	0,0838	13,58	0,0572	0,0470	0,2886	alkalisch	8	33,50
„	10	—	47,5	0			0,0095	0,0078	0	schw. sauer	9	5,55
Champignon	20	—	70	0,6589	0,0162	2,46	0,0226	0,0186	0,3081	„	9	13,25
„	20	—	73	0			0,0134	0,0110	0	„	8	7,85
Blaue Lupinen, etioliert	10	—	70	0,7202			0,2923	0,2404	0,3368	alkalisch	10	171,20
4 tällig, ohne Schalen	10	—	63	0	0,5132	71,26	0,0007	0,0006	0	schw. sauer	9	0,40
„	10	—	70	0			0,00017	0,00014	0	„	9	0,10

1) Diese beiden Versuche wurden mit Weizenkeimen von einer anderen Sendung ausgeführt. Augenscheinlich enthielt dieses Material mehr Urease als das zu den ersten Versuchen verwendete.

In den angeführten Versuchen kam nur Vakuumdestillation bei 35—38° und Magnesiumoxyd zur Anwendung.¹⁾ Aus den Versuchen mit Weizenkeimen ersieht man, daß der Harnstoff bis über 90% gespalten worden war. Der erste Versuch zeigt uns, daß die angewandte Methodik zulässig war, da durch die Verarbeitung keine Abspaltung von Ammoniak aus Harnstoff bewirkt wurde.

Zugleich sieht man auch den Unterschied im Harnstoffspaltungsvermögen bei verschiedenen Pflanzenobjekten oder, was gleich ist, den Unterschied im Gehalte von Urease in denselben. Champignons, bei denen im Argininversuch Harnstoff gefunden werden konnte, enthalten gerade sehr wenig Urease und es ist zu erwarten, daß in Champignons bei einer speziellen Untersuchung Harnstoff entdeckt werden wird.

V. Versuche über den fermentativen Harnstoffaufbau.

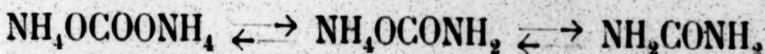
Wenn die direkte Reversibilität der enzymatischen Reaktionen bis jetzt auch noch nicht erwiesen ist, so war es doch von Interesse, nachzuprüfen, ob der theoretisch mögliche reversible Harnstoffaufbau durch Urease aus Ammoncarbonat stattfindet.²⁾

Die Vermutung, daß dieser reversible Prozeß vielleicht sehr leicht stattfinden könnte, war dadurch recht annehmbar,

¹⁾ Es muß erwähnt werden, daß die Ammoniakbestimmung in einem in der Tabelle nicht angeführtem Versuche nicht im Vakuum und mittels Magnesiumoxyd, sondern bei Durchblasen von ammoniakfreier Luft unter Erwärmen auf dem Wasserbade mittels Baryumcarbonat ausgeführt wurde. Jedoch ergaben sich noch nach 20stündiger Destillation beträchtliche Mengen von Ammoniak. In einem anderen auch nicht angeführten Versuche wurde zuerst versucht, das Ammoniak mittels Baryumcarbonat im Vakuum in Freiheit zu setzen; dieses gelang jedoch nicht, da durch späteren Zusatz von Magnesiumoxyd in kurzer Zeit mehr Ammoniak gefunden wurde als bei vorausgegangenem viel längerem Destillieren mit BaCO₃. Daraus kann man ersehen, daß Baryumcarbonat bei diesen Ammoniakbestimmungen nicht anwendbar ist.

²⁾ Bekanntlich wurde bei der von Croft Hill (Journ. Chem. Society, Bd. 73, S. 634 [1898]; Ber. chem. Ges., Bd. 34, S. 1380 [1901]; Proc. Chem. Soc., Bd. 19, S. 99 [1901]; Bd. 17., S. 184 [1901]) nachgewiesenen fermentativen Synthese nicht das Ausgangsprodukt Maltose, sondern die isomere Isomaltose synthetisch gebildet.

daß in dem käuflichen Ammoncarbonat der erste Teil der Reaktion



schon da ist und somit nur der zweite Teil derselben in Frage kommt.

Bekanntlich findet im tierischen Organismus ein Übergang von Ammoniumcarbonat in Harnstoff statt¹⁾ und es wäre nach den Durchleitungsversuchen von W. v. Schroeder²⁾ denkbar, daß es gelingen könnte, diesen Prozeß auf eine reversible Fermentwirkung zurückzuführen.

Es mußte aber mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß nur ein kleiner Teil von Ammoncarbonat in Harnstoff bei Einwirkung von Urease übergeht, denn da ein sehr weitgehender Harnstoffabbau nachgewiesen wurde, konnte das Gleichgewicht mehr nach Ammoncarbonat verschoben angenommen werden.

Die bezüglichen Versuche sind in der Tabelle IV angeführt. In den «Harnstofffraktionen», die nach dem schon beschriebenen Verfahren erhalten wurden, konnte kein Harnstoff als salpetersaures Salz nachgewiesen werden, wenn auch in zwei Versuchen die Menge des zugesetzten Ammoncarbonats so groß war, daß der Harnstoffnachweis sicher sein mußte.

Ein Rückgang des Prozesses, d. h. die Spaltung des synthetisch gebildeten Harnstoffs während der Destillation durch die vorhandene Urease, wurde vermieden, indem das 2 $\frac{1}{2}$ fache Volumen Alkohol vor der Destillation zugesetzt und dadurch die Fermentreaktion gehemmt wurde.

Tabelle IV.

Objekt	Ge- wicht in g	Ammon- carbonat zuge- setzt in g	Ver- suchs- dauer in Std.	Stickstoff im zuge- setzten Salze in g	Stickstoff als NH ₃ gefunden in g	cem $\frac{1}{10}$ -n- Natron- lange, ent- sprechend dem NH ₃	Dauer der Vakuüm- destil- lation in Std.	Proben auf Harn- stoff
Weizen- keime	10	—	149	0,1399	0,1443	102,8	15	0
	25	3,01	315	—	—	—	—	0
	20	—	159	0,3641	0,3831	272,9	12	0

¹⁾ Hammarsten, Lehrb. d. physiol. Chem., 1910, S. 648.

²⁾ Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. 15.

VI. Ammoniakabspaltung bei Argininabbau.

Um das Ausmaß der Desamidierung bei Argininabbau durch sukzessive Einwirkung von Arginase und Urease zu bestimmen, wurden zwei Versuche ausgeführt, die in der Tabelle V zusammengestellt sind. Dabei wurden viel geringere Ammoniakmengen gefunden, als nach der Menge des zurückgewonnenen Arginins (als Pikrat) und nach den schon beschriebenen Versuchen mit Harnstoff zu erwarten war. Diese Tatsache des Zurückhaltens des Ammoniaks konnte keine Erklärung finden.

Tabelle V.

Objekt	Gewicht in g	Versuchsdauer in Stunden	Arginincarbonat			Arginincarbonat zer- setzt in %	Stickstoff in g			Ammoniak-N aus Arginin- ent- standen in g	Harnstoff	Vacuum- destil- lation in Stun- den	Con- tent NaOH ent- spr. dem NH ₃
			zuge- setzt	zu- rück- gew.	zer- setzt		des zer- setzten Argi- nin- car- bonats	der Harn- stoff- gruppe des- selben	als Am- moniak be- stimmt				
Weizen- keime	10	117	0,4843	0,0808	0,4035	83,32	0,1104	0,0552	0,0484	0,0285	0	9	34,50
	10	114	0	—	—	—	—	—	0,0199				
	10	111	0,4558	0,1274	0,3284	72,05	0,0898	0,0449	0,0353				

Das Zurückbleiben des Ammoniaks im Destillationskolben wegen ungenügend langer Destillation ist völlig ausgeschlossen, da in den letzten Stunden bei frischer Säurevorlage und neuem Zusatz von Magnesiumoxyd stets nur ganz minimale, im Bereich der Fehlergrenzen der Bestimmung liegende Mengen von Ammoniak gefunden wurden.

VII. Versuch mit Guanidin.

Wenn auch in Pflanzen die Spaltung des Arginins in Ornithin und Harnstoff erwiesen wurde, so war die erhaltene Menge des Ornithins doch kleiner, als die theoretisch erwartete. Da die weitere Spaltung des Ornithins in den Versuchen unwahrscheinlich war, so mußte an einen nebenbei anders verlaufenden Argininabbau gedacht werden.

Guanidin konnte, wie schon angegeben, in keinem der Versuche erhalten werden. Es war nun die Frage zu entscheiden, ob nicht das gebildete Guanidin gespalten worden

war; nach den schon früher gemachten Literaturangaben war es jedoch nicht wahrscheinlich.

Ein Versuch mit Weizenkeimen und zugesetztem Guanidincarboxonat bestätigte diese Angaben (s. Tabelle VI).

Das Guanidin wurde nicht gespalten und es konnte daher, wenigstens in den in den Versuchen eingehaltenen Bedingungen, aus Arginin nicht gebildet worden sein. Auf Bernsteinsäure wurde in letzteren Versuchen gar nicht geprüft, da der qualitative Nachweis nichts aussagen konnte, der quantitative jedoch nicht sicher ist.

Tabelle VI.

Objekt	Gewicht in g	Versuchsdauer in Stunden	Guanidincarboxonat in g		Ammoniakstickstoff gefunden in g	ccm $\frac{1}{10}$ -n- NaOH entsprechend dem NH_3	Harnstoff nachgewiesen	Vacuumdestillation in Stunden
			zuge- setzt	zer- setzt				
Weizen- keime	10	63	0,5099	0	0,0119	8,50	0	9
	10	64,5	0	—	0,0129	9,20	—	8,5

VII. Versuche zum Nachweis von Agmatin in Pflanzen.

Das Agmatin konnte in den beschriebenen Versuchen bei Argininabbau nicht nachgewiesen werden.

F. Kutscher fand es, wie schon mitgeteilt wurde, in Mutterkorn. Um seine Anwesenheit auch in anderen Pflanzenobjekten nachzuprüfen, wurden folgende zwei Versuche angestellt.

Um zugleich die Frage zu entscheiden, ob schon im Eiweißmolekül selbst in gewissen Fällen die Arginingruppe durch Agmatin vertreten ist, d. h. ob das Agmatin unmittelbar als Eiweißspaltungsprodukt auftritt, wurde ein Spaltungsversuch mit Weizenkeimen vorgenommen.

1250 g Weizenkeime wurden in der für Eiweißkörper üblichen Art mit 33%iger Schwefelsäure gespalten. Doch konnte in der Argininfraktion nur viel Arginin (identifiziert als Pikrat, Zersetzungspunkt 207,5°), jedoch kein Agmatin nachgewiesen werden.

Es war somit weder freies, noch im Eiweiß als einer seiner Bausteine gebundenes Agmatin in Weizenkeimen vorhanden.

Der zweite Versuch, der mit Hefe angestellt wurde, sollte entscheiden, ob nicht bei Autolyse derselben Agmatin entstehe.

2,5 kg Preßhefe (Weinhefe, käufliche Verbandshefe) wurden mit 4 l Wasser unter Chloroform- und Toluolzusatz angerührt und im Brutofen einer 25tägigen Autolyse überlassen. Während dieser Autolyse wurde der größte Teil der Hefe aufgelöst. Der ungelöste Teil wurde abgetrennt, noch einmal mit etwas Wasser digeriert und die gesamten Flüssigkeitsmengen nach einiger Klärung mit Kieselgur nach der üblichen Weise durch Phosphorwolframsäure gefällt und verarbeitet.

In der verhältnismäßig sehr kleinen Argininfraktion wurde ebenfalls kein Agmatin gefunden.

Zum Schlusse erlaube ich mir, Herrn Geheimrat Prof. Dr. A. Kossel für die Teilnahme und das Interesse bei der Ausführung der Arbeit meinen besten Dank auszusprechen.
