

Studien über die Proteinbildung in reifenden Pflanzensamen.

Von

E. Schulze und E. Winterstein.

(Aus dem agrikulturchemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaktion zugegangen am 21. März 1910.)

Während wir über die chemischen Vorgänge, die beim Abbau der Proteine in den Pflanzen nacheinander sich abspielen, schon weitgehende Kenntnisse besitzen,¹⁾ ist dagegen der Verlauf der in den Pflanzen sich vollziehenden Protein-synthese noch unaufgeklärt. Zwar steht fest, daß der in den Proteinmolekülen sich vorfindende Stickstoff in letzter Linie entweder den in die Wurzeln der Pflanzen eingetretenen Ammoniaksalzen und Nitraten oder, falls Mikroben mitwirken, der Atmosphäre entstammt; auch wissen wir, daß nach den Orten, an denen in den Pflanzen Proteine in reichlicher Menge sich bilden, häufig organische Stickstoffverbindungen (Amide) hinfließen, deren Verwendung zur Bildung von Proteinen nicht zu bezweifeln ist. Wie aber bei Verwendung dieser oder anderer Materialien die Synthese der Proteine sich vollzieht, wissen wir zurzeit nicht. Auch ist nicht zu erwarten, daß es bald möglich sein wird, diese Frage zu beantworten. Denn die ihrer experimentellen Erforschung entgegenstehenden Schwierigkeiten sind ohne Zweifel außerordentlich groß. Um zum Ziele zu gelangen, wird man voraussichtlich die beim Studium der Konstitution der Proteine erhaltenen Resultate mit den an

¹⁾ Zur Begründung dieses Ausspruchs verweisen wir auf die Abhandlungen von E. Schulze «Über den Abbau und den Aufbau organischer Stickstoffverbindungen in den Pflanzen» (Landw. Jahrbücher, Bd. XXXV, S. 621—666) und von F. Ehrlich, «Über die chemischen Vorgänge des pflanzlichen Eiweißstoffwechsels und ihre Bedeutung für die alkoholische Gärung und andere pflanzenphysiologische Prozesse» (ibidem 1909, Ergänzungsband V, S. 289—327).

Pflanzen gemachten Beobachtungen kombinieren müssen; es wird aber wohl noch einer Erweiterung unserer Kenntnisse in der einen wie in der anderen Richtung bedürfen, um die obige Frage der Lösung nahe bringen zu können.

Bei dieser Sachlage wird man es als eine der nächstliegenden Aufgaben betrachten müssen, durch Versuche an Pflanzen das bezügliche Beobachtungsmaterial zu vergrößern. Man wird, im Hinblick auf die außerordentlich große Bedeutung, die der in den Pflanzen sich vollziehenden Proteinsynthese im Haushalte der Natur zukommt, wohl behaupten dürfen, daß jeder, auch der kleinste Fortschritt, den wir auf diesem Gebiete machen, für wertvoll zu erklären ist.

Für Untersuchungen, deren Zweck die Erforschung der Proteinbildung ist, hat man stets reifende Pflanzensamen als günstige Objekte angesehen. Denn die Samen gehören zu den proteinreichsten Teilen der Pflanzen und man kann leicht durch quantitative Bestimmungen feststellen, daß ihr Proteingehalt während des Reifens eine rasche Zunahme erfährt, in den reifenden Samen findet also die Synthese von Proteinen in starkem Maße statt. Als stickstoffhaltiges Material für diese Synthese dienen nach den von A. Emmerling¹⁾ an *Vicia faba* angestellten Versuchen lösliche organische Stickstoffverbindungen (Amide), die hauptsächlich in den Blättern entstehen und den reifenden Samen zugeleitet werden, eine Annahme, die auch durch die Arbeiten anderer Forscher eine Stütze erhalten hat.²⁾ Zu diesen Verbindungen gehören nach Emmerlings Beobach-

¹⁾ Landwirtschaftl. Versuchsstationen, Bd. XXXIV, S. 1, Bd. LIV, S. 215.

²⁾ Wir verweisen auf die in der oben zitierten Abhandlung E. Schulzes auf S. 658 ff. darüber gemachten Angaben. Für die Annahme, daß in den reifenden Pflanzensamen Proteine auf Kosten nichtproteinartiger organischer Stickstoffverbindungen sich bilden, hat eine von Zaleski (Berichte der D. Botan. Gesellsch., 1905, Bd. XXIII, S. 126) ausgeführte Untersuchung eine starke Stütze geliefert. Der genannte Forscher halbierte unreife Samen von *Pisum sativum* und analysierte die eine Hälfte sofort, die andere erst nach 3 tägiger Aufbewahrung unter einer Glasglocke in feuchter Luft. Es zeigte sich, daß während der Aufbewahrung in den Samen eine Zunahme des Proteins, eine Abnahme der übrigen Stickstoffverbindungen erfolgt war.

tungen neben Aminosäuren auch Amide, die gleich dem Asparagin und Glutamin durch heiße verdünnte Säuren unter Ammoniakabspaltung zersetzt werden. Welche einzelnen Glieder dieser Stoffgruppen vorhanden waren, ist von Emmerling nicht untersucht worden. Einen Beitrag zur Beantwortung dieser Frage lieferte später N. Wassilieff¹⁾ durch Versuche, für welche verschiedene Leguminosen (*Lupinus albus*, *Lupinus luteus*, *Lupinus angustifolius* und *Rubinia pseudacacia*) als Objekte dienten. In den unreifen Samen dieser Leguminosen fand Wassilieff Asparagin, Arginin, Histidin und Phenylalanin; wahrscheinlich war auch Aminovaleriansäure (Valin) vorhanden. Durch eine zweite, erst vor kurzem publizierte Untersuchung²⁾ hat Wassilieff zwar unsere Kenntnisse über die Qualität der in unreifen Samen sich vorfindenden Stickstoffverbindungen nicht wesentlich erweitert, aber er hat doch einige Beobachtungen gemacht, die hier Interesse beanspruchen können. Er zeigte u. a., daß die Samenhülsen Stickstoffverbindungen an die reifenden Samen abgeben und demnach als Reservestoffbehälter dienen;³⁾ ferner wies er nach, daß beim Aufbewahren der unreifen von der Pflanze abgetrennten Früchte von *Lupinus albus* das in letzteren enthaltene Asparagin auf Kosten anderer Stickstoffverbindungen eine Zunahme erfährt. Daß dies so sein würde, ließ sich von vornherein erwarten, denn es ist von früher her bekannt, daß in jungen grünen Pflanzenteilen Asparagin sich bildet, wenn man dieselben unter geeigneten Bedingungen aufbewahrt.⁴⁾

Einige im Jahre 1905 von uns ausgeführte Versuche, für welche *Pisum sativum*, und zwar die als «Zuckererbse» be-

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

²⁾ Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft, Jahrgang 1908.

³⁾ Wassilieff bewahrte die vom Stamme abgetrennten Früchte unter solchen Bedingungen auf, daß sie nicht austrocknen konnten. Nach Verlauf von einigen Tagen hatte die in den Hülsen enthaltene absolute Stickstoffmenge sich verringert, freilich nur um einen geringen Betrag. Gleichzeitig hatte die Proteinmenge in den Hülsen abgenommen; es hatte also Zerfall von Proteinstoffen stattgefunden.

⁴⁾ Wir verweisen auf die Abhandlung von E. Schulze und E. Bossard, Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 420.

zeichnete Varietät, als Objekt diente, lieferten Resultate, die zur Bestätigung der schon damals vorliegenden Angaben Wassilieffs dienen konnten. Wir vermochten sowohl aus den unreifen Samen, wie aus den Samenhülsen der genannten Leguminose Asparagin und Arginin darzustellen. Zu bemerken ist, daß die Ausbeute an Arginin bei den Samenkörnern viel größer war als bei den Hülsen. Dieser Befund ist in einer früher publizierten Abhandlung¹⁾ kurz erwähnt worden; eine ausführliche Mitteilung über denselben ist aber bis jetzt nicht erfolgt. Der Grund dafür liegt zum Teil darin, daß wir das von uns damals verwendete, dem Handel entnommene Material nicht als ganz einwurfsfrei betrachten konnten. Denn es ist möglich, daß dieses Material, ehe es in unsere Hände gelangte, vom Händler einige Tage aufbewahrt worden war; während dieser Zeit kann aber, wie aus den oben gemachten Angaben hervorgeht, die Bildung von Asparagin auf Kosten anderer Stickstoffverbindungen erfolgt sein. Schon damals war es unsere Absicht, die Versuche mit ganz frischem Material zu wiederholen; dies ist aber erst im Jahre 1909 geschehen. Wir haben uns aber, wie aus den später folgenden Angaben zu ersehen ist, nicht auf eine Wiederholung der früher ausgeführten Versuche beschränkt, sondern auch noch einige andere, auf die Proteinbildung sich beziehende Fragen der Untersuchung unterworfen.

Im Jahre 1905 untersuchten wir auch milchreife Weizenkörner. Auch diese Untersuchung, deren Ergebnisse bisher ebenfalls nicht ausführlich publiziert worden sind, haben wir jetzt wiederholt. Die dabei erhaltenen Resultate teilen wir im zweiten Abschnitt dieser Abhandlung mit.

Das Untersuchungsmaterial (Erbsen und Weizenkörner) wurde uns in vortrefflicher Qualität von der landwirtschaftlichen Schule Strickhof bei Zürich geliefert, wofür wir der Direktion dieser Schule hier unseren besten Dank aussprechen.

Zu erwähnen ist noch, daß an der Ausführung der im folgenden mitgeteilten analytischen Bestimmungen Herr C. Reuter sich beteiligt hat, wofür wir demselben zu Dank verpflichtet sind.

¹⁾ Landwirtschaftl. Jahrbücher, Bd. XXXV, S. 656.

I. Untersuchung der Früchte von *Pisum sativum* L. in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Die Früchte von *Pisum sativum* wurden in verschiedenen Entwicklungsstadien von uns untersucht. Nachdem sie früh morgens von den Pflanzen abgetrennt worden waren, wurden sie sofort in das Laboratorium gebracht und in Samenkörner und Hülsen zerlegt. Jeden dieser beiden Teile extrahierten wir, nachdem er möglichst fein zerkleinert worden war, mit Wasser. Für die Samenkörner verwendeten wir wegen ihres bedeutenden Stärkemehlgehalts Wasser von ca. 55° C., für die Hülsen dagegen Wasser, dessen Temperatur dem Siedepunkt näher lag. Nach Verlauf einiger Stunden wurden die Extrakte abfiltriert und mit den beim Abpressen der Filterrückstände erhaltenen Flüssigkeiten vereinigt; diese Extrakte versetzten wir dann mit Bleiessig in schwachem Überschuß. Die beschriebenen Operationen wurden im Verlaufe eines Tages vollendet. Wie die Extrakte weiter behandelt wurden, ist aus den später folgenden Mitteilungen zu ersehen.

Für die quantitative Analyse verwendeten wir Proben der Samenkörner und der Hülsen, welche unmittelbar nach ihrer Trennung in absoluten Alkohol geworfen worden waren. Nach ca. 14 Tagen wurde der Alkohol abgegossen und durch frischen ersetzt. Nachdem auch letzterer abgegossen worden war, trockneten wir die Samen und die Hülsen bei 35—40° C., was sehr leicht vonstatten ging. Bei Ausführung der quantitativen Bestimmungen wurden den abgewogenen Quantitäten der getrockneten Samen und Hülsen die entsprechenden Anteile der alkoholischen Lösungen zugefügt.

Die im «ersten Entwicklungsstadium» befindlichen Schoten enthielten stets neben sehr kleinen auch bedeutend größere Samenkörner. Um den Größenunterschied zu kennzeichnen, teilen wir mit, daß 100 Stück der kleineren Körner durchschnittlich 9,0 g wogen, 100 Stück der größeren Körner dagegen durchschnittlich fast 21 g. Wir haben daher für die quantitative Analyse sowohl von den kleineren wie von den größeren Körnern eine Durchschnittsprobe verwendet. Zur qualitativen

Untersuchung diente dagegen ein Gemenge der kleinen und der größeren Körner. Die diesem Entwicklungsstadium angehörenden Früchte wurden Mitte Juli geerntet. Bei den im zweiten Entwicklungsstadium sich befindenden Früchten, die in der zweiten Hälfte des Monats Juli geerntet wurden, zeigte sich in der Größe der Samenkörner nur eine geringe Verschiedenheit; 100 Stück dieser Samen wogen durchschnittlich 74 g.

Die ausgereiften Früchte wurden in der zweiten Hälfte des Monats August geerntet. Wir ließen sie nach der Abtrennung von den Pflanzen noch einige Wochen lang an einem trocknen Orte liegen; dann wurden die Samen von den Hülsen getrennt. Eine Aufbewahrung der für die quantitative Analyse bestimmten Körner und Hülsen unter Alkohol war selbstverständlich in diesem Falle unnötig.

A. Vergleichung der in den Samenkörnern ungleichen Alters auf Proteine und nichtproteinartige Verbindungen fallenden Stickstoffmengen.

Durch Bestimmung der in den unreifen und in den reifen Samenkörnern auf Proteine und auf nichtproteinartige Verbindungen fallenden Stickstoffmengen kann man Aufschluß über das Fortschreiten der Proteinbildung in den reifenden Samen erhalten. Doch genügt es nicht, zu diesem Zwecke die Resultate dieser Bestimmungen in Prozenten der Samentrockensubstanz anzugeben, man muß auch feststellen, wieviel Gramm Stickstoff in der gleichen Anzahl reifer und unreifer Samen den genannten beiden Stoffgruppen angehören.

In einer in unserem Laboratorium ausgeführten Untersuchung reifender Samen von *Phaseolus vulgaris* in drei Entwicklungsstadien erhielt U. Pfenninger¹⁾ für den Prozentgehalt der Samentrockensubstanz an «Proteinstickstoff» und «Nichtproteinstickstoff»²⁾ folgende Zahlen:

¹⁾ Berichte der D. botanischen Gesellsch., 1909, Bd. XXVII, Heft V (Vorläufige Mitteilung).

²⁾ Es möge uns gestattet sein, der Kürze halber hier diese Ausdrücke, die auch in anderen Abhandlungen zu finden sind, zu gebrauchen.

	N im Protein %	N im Nichtprotein %
Erstes Stadium	3,59	1,41
Zweites >	3,37	0,55
Drittes > (Reife) .	4,01	0,22

Während des Reifens verschob sich also das Verhältnis zwischen «Proteinstickstoff» und «Nichtproteinstickstoff» zugunsten des ersteren. In den unreifen Samen fielen im ersten Entwicklungsstadium nur 71,80% des Gesamtstickstoffs auf Proteine, in den reifen Samen dagegen 94,80%.

Bei Berechnung der in 100 Stück Samen enthaltenen Stickstoffmengen erhielt U. Pfenninger (loc. cit.) aber folgende Zahlen:

	N im Protein g	N im Nichtprotein g
Erstes Stadium	0,0204	0,0080
Zweites >	0,2858	0,0467
Drittes > (Reife) .	1,804	0,0989

Aus diesen Zahlen ist zu ersehen, daß während des Reifens die Proteinmenge in den Samen sehr stark zugenommen hatte, daß aber die reifen Samen nicht weniger, sondern sogar mehr «Nichtproteinstickstoff» enthielten als die unreifen Samen.

Im Sommer d. J. wiederholte U. Pfenninger seine Versuche; doch analysierte er die unreifen Samen von *Phaseolus vulgaris* nur in einem Entwicklungsstadium. Letzteres lag zwischen den beiden Stadien, in denen er früher die unreifen Samen untersucht hatte. Von den dabei erhaltenen, bisher noch nicht publizierten Resultaten teilen wir hier nur die Zahlen mit, die sich für den Gehalt von 100 Stück Samen an Proteinstickstoff und Nichtproteinstickstoff berechnen.

	N im Protein g	N im Nichtprotein g
Unreife Samen	0,1347	0,0156
Reife >	1,5128	0,0235

Wie man sieht, stimmte das in diesen Versuchen erhaltene Resultat vollständig mit demjenigen überein, zu welchem Pfenninger früher gelangt war; 100 Stück Samen enthielten nach völligem Ausreifen eine etwas größere Quantität von «Nichtproteinstickstoff» als in unreifem Zustande. Auch in diesem Falle hatte die Proteinmenge während des Ausreifens der Samen eine sehr starke Steigerung erfahren. Doch enthielten 100 Stück der reifen Samen weniger «Proteinstickstoff», als in den früher von Pfenninger untersuchten Samen solcher Art gefunden worden war. Der Grund dafür liegt höchstwahrscheinlich in der ungünstigen Witterung, die im Sommer 1909 lange Zeit hindurch herrschte.

Die in diesen Versuchen erhaltenen Resultate müssen zu der Vorstellung führen, daß bei *Phaseolus vulgaris* die aus den anderen Pflanzenteilen den reifenden Samenkörnern zugeführten nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen sehr schnell zur Proteinsynthese verwendet werden und daß es infolge davon zu einer Anhäufung solcher Verbindungen in den reifenden Samen gar nicht kommt.

Nicht ganz das gleiche Resultat ergab sich für die Samen von *Pisum sativum*. Diese Samen wurden, wie oben schon angegeben worden ist, in drei Entwicklungsstadien von uns untersucht. In den Schoten, die dem ersten Entwicklungsstadium angehörten, fanden sich neben größeren stets auch noch sehr kleine Samenkörner vor, wie oben gleichfalls schon erwähnt worden ist; die für die Analyse benutzten Durchschnittsproben dieser Samenkörner sind im folgenden mit Ia und Ib bezeichnet worden. Wir teilen nun zunächst die Zahlen mit, die für den Prozentgehalt der Samen an Gesamtstickstoff, Proteinstickstoff und Nichtproteinstickstoff gefunden wurden.¹⁾

¹⁾ Zur Bestimmung der auf Protein fallenden Stickstoffmenge benutzten wir das Stutzersche Verfahren, welches bei Untersuchungen solcher Art fast immer verwendet worden ist. Wir halten die auf diesem Wege gewonnenen Resultate nicht für fehlerfrei (eine scharfe Trennung des Proteins von den nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen dürfte überhaupt wohl sehr schwierig sein), aber man wird doch annehmen können, daß diese Resultate untereinander vergleichbar sind. Die dem «Nichtprotein» angehörende Stickstoffmenge wurde durch Subtraktion des

	Die Samentrockensubstanz enthielt		
	Stickstoff im Protein %	Stickstoff im Nichtprotein %	Stickstoff insgesamt %
Stadium I a)	2,68	2,36	5,04
Stadium I b)	2,12	2,51	4,63
Stadium II	3,35	1,04	4,39
Stadium III (Reife) .	4,40	0,39	4,79

In den im ersten Entwicklungsstadium geernteten, noch recht kleinen Samenkörnern fiel also mehr als die Hälfte des Gesamtstickstoffs auf nichtproteinartige Verbindungen, während der diesen Verbindungen angehörende Teil des Gesamtstickstoffs in den Samen des zweiten Entwicklungsstadiums nur noch 23—24 % betrug; in den ausgereiften Samen war dieser Betrag auf ca. 8 % des Gesamtstickstoffs heruntergegangen.

Aus den vorstehenden und aus den für das Trockengewicht von je 100 Stück Samen gefundenen Zahlen leiten sich die folgenden Werte ab:

	100 Stück Samen enthielten		
	Stickstoff im Protein g	Stickstoff im Nichtprotein g	Stickstoff insgesamt g
Stadium I a)	0,0398	0,0348	0,0746
Stadium I b)	0,0866	0,1024	0,1890
Stadium II	0,610	0,195	0,805
Stadium III (Reife) .	1,505	0,096	1,601

Die Zahlen der vorstehenden Tabelle zeigen, daß in den Samen die auf nichtproteinartige Stickstoffverbindungen fallende absolute Stickstoffmenge vom ersten bis zum zweiten Entwicklungsstadium zunahm, später aber sich verringerte. Im zweiten Entwicklungsstadium ließ sich also eine, allerdings nicht bedeutende Anhäufung solcher Stickstoffverbindungen nachweisen, was bei den Samen von *Phaseolus vulgaris* nicht in gleicher

Proteinstickstoffs vom Gesamtstickstoff gefunden. Alle Stickstoffbestimmungen wurden nach dem Kjeldahlschen Verfahren ausgeführt.

Weise der Fall war. Trotzdem wird man im Hinblick auf das starke Anwachsen der Proteinmenge während des Reifens der Samen behaupten dürfen, daß auch bei *Pisum sativum* die den Samen aus den andern Pflanzenteilen zufließenden nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen rasch zur Proteinsynthese verwendet wurden. Auch ist noch darauf aufmerksam zu machen, daß die während des zweiten Entwicklungsstadiums eingetretene Anhäufung von «Nichtproteinstickstoff» zum großen Teil in Form von Arginin erfolgte¹⁾ und vielleicht nur darauf beruhte, daß diese Base aus irgend einem Grunde der Verwendung zur Proteinsynthese entging.²⁾

Die aus den vorstehenden Angaben sich ableitende Schlußfolgerung, daß in den reifenden Samen die nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen, soweit sie überhaupt zur Proteinsynthese sich eignen, rasch für diesen Zweck verwendet werden, scheint auch für die Samen des Weizens (*Triticum vulgare*) volle Geltung zu haben (wir verweisen auf die im Abschnitt II dieser Abhandlung darüber gemachten Mitteilungen).

B. Die nicht proteinartigen stickstoffhaltigen Bestandteile der Samenkörner und Samenhülsen.

Wie im vorigen Abschnitt dargelegt worden ist, muß das rasche Anwachsen der Proteinmenge in den reifenden Samen zu der Vorstellung führen, daß die den letzteren aus andern Pflanzenteilen zufließenden nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen, soweit sie ein für die Proteinsynthese brauchbares Material sind, im allgemeinen eine schnelle Verwendung für diese Synthese finden. Daraus folgt aber noch nicht, daß die verschiedenen Verbindungen dieser Art gleich schnell diesem Zwecke dienen; es ist für möglich, ja sogar für wahrscheinlich zu erklären, daß manche dieser Stoffe rascher, andere lang-

¹⁾ Dies wird durch die weiter unten gemachten Angaben bewiesen.

²⁾ Auch die Anhäufung von Arginin in den Keimpflanzen von *Lupinus luteus* scheint man darauf zurückführen zu müssen, daß aus einem zurzeit noch unbekannten Grunde in diesen Keimpflanzen ein Abbau des Arginins nicht erfolgt.

samer für jene Synthese verwendet werden.¹⁾ Ist dies aber der Fall, so wird das Gemenge nichtproteinartiger Stickstoffverbindungen, das man in den in irgend einem Entwicklungsstadium geernteten unreifen Samenkörnern neben Proteinen noch vorfindet, eine andere Zusammensetzung haben müssen, als das aus den andern Pflanzenteilen dem Samen zufließende Gemenge solcher Verbindungen. Es ist klar, daß durch diesen Umstand der Wert der Resultate verringert wird, die man bei Untersuchung der reifenden Samen auf Stoffe solcher Art erhält. Um festzustellen, welche nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen in den reifenden Samen für die Proteinsynthese verwendet werden, wird man in erster Linie die Zusammensetzung des den Samen aus andern Pflanzenteilen zufließenden Gemenges solcher Verbindungen zu berücksichtigen haben. Selbstverständlich aber kann es von Interesse sein, zum Vergleich die Resultate heranzuziehen, die man bei Untersuchung der stickstoffhaltigen Bestandteile der unreifen und der reifen Samenkörner erhält.

Wie schon in der Einleitung erwähnt wurde, nimmt man an, daß die als Material für die Proteinsynthese dienenden Stickstoffverbindungen vorzugsweise in den Blättern sich bilden. Zur Auffindung dieser Stoffe sind die Blätter und Stengel grüner Pflanzen wegen ihrer komplizierten Zusammensetzung keine besonders günstigen Objekte. Unter diesen Umständen ist es von Wichtigkeit, daß bei den Papilionaceen die Samenhülsen als Reservestoffbehälter dienen und an die reifenden Samen beträchtliche Quantitäten stickstoffhaltiger Stoffe abgeben. Dies ist von U. Pfenninger in seiner oben schon erwähnten Untersuchung, für welche *Phaseolus vulgaris* als Objekt diente, in überzeugender Weise gezeigt worden, nachdem kurz vorher schon N. Wassilieff²⁾ aus Versuchen, die an *Lupinus albus* angestellt wurden, die gleiche Schlußfolgerung gezogen hatte. Wir konnten leicht nachweisen, daß auch bei *Pisum sativum*

¹⁾ Beim Aussprechen dieser Ansicht stützen wir uns auf die an Keimpflanzen gemachten Beobachtungen.

²⁾ Berichte der D. botanischen Gesellschaft, Bd. XXVI, S. 454 (1908) (Vorläufige Mitteilung).

die Samenhülsen als Reservestoffbehälter dienen. Wir bestimmten sowohl in unreifen wie in ausgereiften Hülsen das Trockengewicht und den prozentigen Stickstoffgehalt. Aus den dabei erhaltenen Resultaten leiten sich folgende Zahlen ab:

	100 Stück Hülsen von <i>Pisum sativum</i> enthielten		
	Stickstoff im Protein g	Stickstoff im Nichtprotein g	Stickstoff insgesamt g
Unreif (Stadium II) .	1,150	1,040	2,190
Reif	0,552	0,089	0,641

Diese Zahlen beweisen, daß während des Reifens die in den Hülsen enthaltene absolute Stickstoffmenge sich bedeutend verringert hatte; sie war bis auf ca. 30% der ursprünglich vorhandenen Quantität gesunken. Da man nun, wie kaum gesagt zu werden braucht, nicht annehmen kann, daß während des Wachstums der Hülsen eine Entwicklung von freiem Stickstoff oder von flüchtigen Stickstoffverbindungen erfolgte, so führen die obigen Zahlen zu der Schlußfolgerung, daß stickstoffhaltige Stoffe aus den Hülsen in die reifenden Samenkörner übergingen. Dementsprechend verringerte sich auch der Gehalt der Hülsen an nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen während des Reifens in sehr starkem Maße. Aber auch die in den Hülsen enthaltene Proteinmenge erfuhr eine Abnahme. Letztere erfolgte offenbar in der Weise, daß während des Reifens der Hülsen ein Abbau des Proteins stattfand und daß die dabei entstandenen Produkte den reifenden Samenkörnern zufließen.

Die von uns an den Samenhülsen von *Pisum sativum* gemachten Beobachtungen liefern somit eine Bestätigung der von Wassilieff (loc. cit) und von Pfenninger (loc. cit) ausgesprochenen Schlußfolgerung, daß bei den Leguminosen die Samenhülsen als Reservestoffbehälter dienen und daß aus ihnen stickstoffhaltige Stoffe in die reifenden Samenkörner übergehen. Pfenninger zeigte, daß das Gleiche auch für stickstofffreie Bestandteile der Samenhülsen gilt. Auch bei *Pisum sativum*

dienten ohne Zweifel gewisse stickstofffreie Bestandteile der Samenhülsen als Reservematerial.

Wir gehen nun zur Mitteilung der bei der qualitativen Untersuchung der Samenhülsen und Samenkörner erhaltenen Resultate über.

a) Samenhülsen.

Wie oben schon erwähnt worden ist, wurden die unreifen Früchte von *Pisum sativum* in zwei verschiedenen, durch die ungleiche Größe der Samenkörner charakterisierten Entwicklungsstadien von uns geerntet. Es war zu erwarten, daß die diesen beiden Entwicklungsstufen angehörenden Samenhülsen in der Zusammensetzung nur wenig differierten. Denn die Zeitpunkte, in denen die Ernte der mit «Stadium I» und «Stadium II» bezeichneten Früchte erfolgte, lagen nur um zirka eine Woche auseinander. Innerhalb dieser kurzen Zeit hatten unter dem Einfluß heißen Wetters die vorher durch kühle Witterung im Wachstum zurückgehaltenen Samenkörner sehr rasch an Größe und an Gewicht zugenommen; doch war ein Wachstum der Samenhülsen nicht in gleichem Maße eingetreten. Trotzdem aber haben wir die jenen beiden Entwicklungsstadien angehörenden Hülsen getrennt untersucht.

Ungefähr 3 kg der im ersten Entwicklungsstadium geernteten Hülsen wurden zerkleinert und sodann mit heißem Wasser extrahiert. Der vom Rückstande getrennte Extrakt wurde nach dem Hinzufügen der beim Auspressen dieses Rückstandes erhaltenen Flüssigkeit mit Bleiessig versetzt. Das Filtrat vom Bleiessigniederschlag teilten wir in zwei gleiche Teile. Der einen Hälfte wurde Mercurinitrat zugefügt, wobei ein sehr starker weißer Niederschlag entstand; die zweite Hälfte versetzten wir, nachdem sie mit Schwefelsäure stark angesäuert und sodann filtriert worden war, mit Phosphorwolframsäure.

Der Mercurinitratniederschlag wurde nach dem Auswaschen zwischen Fließpapier abgepreßt, dann mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber wurde mit Ammoniak neutralisiert, hierauf in gelinder Wärme zum dünnen Sirup eingengt. Dieser Sirup lieferte nach dem Erkalten nur

Krystalle von Asparagin. Letzteres wurde durch seine Reaktionen und durch Bestimmung seines Krystallwassergehaltes identifiziert (wobei zwei, nach einander erhaltene Krystallfraktionen verwendet wurden). Diese Bestimmungen lieferten folgende Resultate.

I. 0,3150 g Substanz gaben 0,0370 g = 11,79% Wasser.

II. 0,5550 » » » 0,0650 » = 11,8% »

Nach der Theorie beträgt der Krystallwassergehalt des Asparagins 12,0%.

Ferner wurde noch der Kupfergehalt der aus unserem Produkt dargestellten Kupferverbindung bestimmt; dabei ergab sich folgendes Resultat:

0,2214 g Substanz gaben 0,0544 g CuO = 19,63% Cu.

Die Theorie verlangt 19,4%.

Die von den Asparaginkrystallisationen abgegossene Mutterlauge, in der das Vorhandensein von Arginin vermutet werden konnte, wurde mit Schwefelsäure angesäuert und hierauf mit Phosphorwolframsäure versetzt, der dadurch erzeugte Niederschlag mit dem aus dem zweiten Teile des Extraktes (vgl. oben) erhaltenen vereinigt.

Dem Filtrat vom Mercurinitratniederschlage fügten wir noch etwas Mercurinitrat, hierauf Natronlauge bis zur schwach alkalischen Reaktion zu. Der dadurch erzeugte Niederschlag wurde mittels Schwefelwasserstoff zersetzt, die vom Schwefelquecksilber abfiltrierte Lösung im Wasserbade zum Sirup eingedunstet.

Diesen Sirup erhitzen wir mit absolutem Alkohol und fügten dann etwas konzentrierte Ammoniakflüssigkeit zu, die dabei entstandene Lösung wurde vom sirupösen Rückstande abgegossen und sodann eingedunstet; sie lieferte nun eine Ausscheidung, welche nach dem Umkrystallisieren aus einem Gemisch von heißem Alkohol und Ammoniakflüssigkeit das Aussehen und das Verhalten von unreinem Leucin zeigte. Die Substanz war stickstoffhaltig. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol, welchem etwas Ammoniakflüssigkeit zugefügt worden war, bildete sie weiße glänzende Krystallblättchen, die beim Erhitzen im Glasröhrchen vollständig sublimierten und dabei den Geruch entwickelten, der bei gleicher Behandlung

des Leucins und des Valins auftritt. Da die wässrige Lösung der Krystalle beim Erhitzen mit Kupferacetat sich zwar lazurblau färbte, aber weder in der Wärme noch nach dem Erkalten eine Ausscheidung lieferte, so ist wahrscheinlich, daß nicht Leucin, sondern Valin vorlag; doch kann die Substanz auch ein Gemenge dieser beiden Aminosäuren gewesen sein.

Der in oben beschriebener Weise erhaltene Phosphorwolframsäureniederschlag wurde mittels Baryumhydroxyd zer setzt. Die dabei gewonnene, vom Ammoniak befreite Basenlösung neutralisierten wir mit Salpetersäure, engten sie stark ein und fügten dann Silbernitrat zu. Dabei entstand ein ziemlich starker Niederschlag, der nach Zusatz von etwas Salzsäure durch Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. Die vom Schwefelsilber abfiltrierte Lösung enthielt Alloxurbasen; sie gab mit ammoniakalischem Silbernitrat den für diese Basen charakteristischen, in Ammoniakflüssigkeit unlöslichen Niederschlag; aus der Lösung dieses Niederschlags in kochender Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,10 schieden sich beim Erkalten weiße Krystalle aus.

Die von dem Alloxurbasenniederschlage abfiltrierte Lösung versetzten wir zur Fällung von Histidin und Arginin nach bekanntem Verfahren mit Silbernitrat und Barytwasser. Die Histidinfraktion des Niederschlags wurde unter Zusatz von etwas Schwefelsäure durch Schwefelwasserstoff zerlegt, die dabei erhaltene Lösung stark eingeengt und sodann mit Quecksilbersulfat versetzt. Den durch dieses Reagens hervorgebrachten Niederschlag verarbeiteten wir nach der von Kossel und Patten¹⁾ gegebenen Vorschrift. Dabei konnte zwar nicht Histidin in einer zur Ausführung einer Analyse genügenden Quantität gewonnen werden, aber das Produkt gab doch die von Pauli²⁾ für das Histidin angegebene Reaktion, so daß das Vorhandensein dieser Base als nachgewiesen zu betrachten ist. Die Argininfraktion des Niederschlags lieferte, als sie in bekannter Weise verarbeitet wurde, Arginin in kleiner Menge. Letzteres wurde zunächst in das Nitrat übergeführt. Das Ge-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 39.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 508.

wicht dieses Produkts betrug aber nur ca. 0,1 g. Dasselbe wurde in die Kupferverbindung übergeführt. Letztere krystallisierte in der charakteristischen Form; der Schmelzpunkt der durch Umkrystallisieren gereinigten Verbindung entsprach der für das Argininkupfernitrat gemachten Angabe (112—114°).

Aus dem Filtrat vom Argininsilberniederschlage konnten wir zwei, in ihrem Verhalten mit Cholin und mit Trigonellin übereinstimmende Basen nach bekanntem Verfahren isolieren. Von den salzsauren Salzen dieser beiden Basen löste sich das eine in kaltem absolutem Alkohol; es krystallisierte in zerfließlichen kleinen Prismen. Seine wässrige Lösung gab die für das Cholin angegebenen Reaktionen; insbesondere brachte Kaliumtrijodid auch nach Zusatz von Soda darin eine Fällung hervor. Das Platindoppelsalz krystallisierte beim langsamen Verdunsten seiner wässrigen Lösung in orangeroten Tafeln. Die Ausführung einer Analyse hielten wir für unnötig, da das Vorkommen von Cholin in den Samenhülsen von *Pisum sativum* früher schon von uns nachgewiesen worden ist.¹⁾ Das salzsaure Salz der zweiten Base war in kaltem absolutem Alkohol fast unlöslich; es krystallisierte, wie das Trigonellinchlorid, aus wässriger Lösung in kleinen luftbeständigen Tafeln. Charakteristisch für Trigonellin ist bekanntlich das basische Golddoppelsalz, das man beim Umkrystallisieren des neutralen Chloraurats aus Wasser erhält. Dieses basische Salz krystallisiert in feinen gelben Nadeln, die ohne Zersetzung bei 185—186° schmelzen. Das in der angegebenen Weise aus der zweiten Base von uns dargestellte Golddoppelsalz schmolz bei 184°. Die kleine Differenz zwischen diesem Befunde und dem für das basische Chloraurat des Trigonellins angegebenen Schmelzpunkt kann als unwesentlich betrachtet und auf das Vorhandensein einer geringen Verunreinigung zurückgeführt werden. Übrigens ist auch das Vorkommen von Trigonellin in den Samenhülsen von *Pisum sativum* früher schon von uns nachgewiesen worden.

Die Hülsen der im zweiten Entwicklungsstadium geernteten Samen wurden von uns nicht auf Asparagin untersucht, da

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LX, S. 155.

dieses Amid nicht nur in den dem ersten Entwicklungsstadium angehörenden Hülsen, sondern auch schon in den im Jahre 1905 von uns untersuchten Samenhülsen der Erbse nachgewiesen worden war. Dagegen haben wir jene Hülsen, nachdem sie zuvor bei 60—70° getrocknet und sodann zerkleinert worden waren, nach bekanntem Verfahren auf Arginin untersucht. Letzteres ließ sich nachweisen, doch war die Ausbeute daran sehr gering; wir vermochten aus 500 g der lufttrockenen Hülsen nur ca. 0,05 g Argininnitrat zu gewinnen. Behufs der Identifizierung wurde dieses Produkt auch in diesem Falle in die Kupferverbindung übergeführt.

Einen alkoholischen Extrakt aus 500 g der gleichen lufttrockenen Samenhülsen untersuchten wir auf Monoaminosäuren. Der Extrakt wurde der Destillation unterworfen, der dabei erhaltene Rückstand mit Wasser behandelt, die trübe Flüssigkeit mit Bleiessig versetzt. Dem Filtrat vom Bleiniederschlag fügten wir nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure und nach nochmaliger Filtration Phosphorwolframsäure zu, beseitigten den durch dieses Reagens erzeugten Niederschlag und setzten dem Filtrat Baryumhydroxyd bis zum Eintreten alkalischer Reaktion zu. Nachdem zur Entfernung gelösten Baryts Kohlensäure eingeleitet worden war, wurde die Fällung abfiltriert und mit heißem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat lieferte beim Eindunsten einen Sirup, der neben Aminosäuren eine große Quantität von Kohlenhydraten enthielt. Diesen Sirup behandelten wir behufs Veresterung der darin enthaltenen Aminosäuren mit Alkohol und Salzsäure nach der Vorschrift von E. Fischer. Die Ester wurden sodann aus der dunkel gefärbten Masse mit Äther extrahiert, später der Destillation im Vakuum unterworfen. Der größte Teil der Ester ging bei 12 mm zwischen 80—105° über. Beim Verseifen des Destillats erhielten wir in kleiner Menge ein Produkt, welches das Aussehen und das Verhalten des Leucins zeigte. Nach dem Umkrystallisieren aus einem Gemisch von Alkohol und Ammoniakflüssigkeit bildete es weiße glänzende, in kaltem Wasser schwer lösliche Blättchen, die beim Erhitzen im Glasröhrchen ein weißes Sublimat lieferten. Die wässrige Lösung gab beim Erhitzen mit Kupferacetat eine

lasurblaue Flüssigkeit, aus der eine krystallinische, dem Leucinkupfer gleichende Verbindung sich ausschied. Auch die übrigen Eigenschaften des beschriebenen Produktes sprachen dafür, daß Leucin vorlag.

Wir haben endlich in den Samenhülsen auch noch Tryptophan nachweisen können. Für den bezüglichen Versuch verwendeten wir einen wässerigen Extrakt aus einem Kilogramm der frischen Samenhülsen. Da wir in diesem Falle ganz ebenso verfahren wie beim Nachweis des Tryptophans in den Keimpflanzen von *Vicia sativa*¹⁾ und da die Resultate sich mit den damals erhaltenen vollkommen decken, so halten wir es für überflüssig, hier alle Einzelheiten zu beschreiben. Es genügt, auf die in der zitierten Abhandlung gemachten Angaben zu verweisen. Aus den im vorigen gemachten Angaben ist zu schließen, daß die Samenhülsen neben einer ansehnlichen Quantität von Asparagin kleine Mengen Arginin, Histidin, Tryptophan und Monoaminosäuren der fetten Reihe (Leucin, vielleicht auch Valin) enthielten.

Es schien angezeigt, einen Versuch zur quantitativen Bestimmung des Asparagingehalts der Hülsen nach dem Sachsse'schen Verfahren zu machen. Wir verwendeten dazu einen wässerigen Extrakt aus 1,6278 g der Trockensubstanz der Hülsen. Dieser Extrakt wurde zur Entfernung von Proteinstoffen und von basischen Stickstoffverbindungen mit Phosphorwolframsäure versetzt. Aus dem Filtrat von dem durch dieses Reagens hervorgerufenen Niederschlag entfernten wir die Phosphorwolframsäure durch Zusatz von Barytwasser; dann wurde die Flüssigkeit in vorschriftsmäßiger Weise mit Salzsäure gekocht, hierauf der Destillation mit Magnesia unterworfen. Dabei erhielten wir 0,044 g Stickstoff in Ammoniakform. Unter der Voraussetzung, daß dieses Ammoniak ausschließlich durch Zersetzung von Asparagin entstanden war, berechnet sich der Asparagingehalt der Trockensubstanz der Hülsen auf 2,45%; die diesem Amid angehörende Stickstoffmenge würde demgemäß 0,52% der Hülsentrockensubstanz betragen haben. Da nun diese Trocken-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 56.

substanz 1,14% Nichtproteinstickstoff enthielt, so ergibt sich, daß nicht viel weniger als die Hälfte davon in Form von Asparagin sich vorfand. Es sei hier daran erinnert, daß auch in den Keimpflanzen der Leguminosen das Asparagin in weit größerer Quantität auftritt, als irgend eine andere nichtproteinartige Verbindung.

Von der im ganzen den nichtproteinartigen Verbindungen angehörenden Stickstoffmenge fielen nur ca. 12% auf die aus eiweißfreiem Extrakt durch Phosphorwolframsäure fällbaren Verbindungen. Diesem Befunde entspricht die Tatsache, daß wir in den Hülsen Arginin und andere basische Stickstoffverbindungen nur in sehr kleiner Menge vorfanden.

b) Samenkörner.

Die unreifen Körner (Stadium I und II) wurden in ganz frischem Zustande möglichst fein zerkleinert und sodann mit Wasser von ca. 55° übergossen; nach Verlauf von einigen Stunden wurde der Extrakt abfiltriert, mit der beim Auspressen des Rückstandes erhaltenen Flüssigkeit vereinigt und hierauf mit Bleiessig in schwachem Überschuß versetzt. Der vom Bleiniederschlag abfiltrierten Flüssigkeit fügten wir Mercurinitrat zu, so lange als noch ein Niederschlag sich bildete. Dieser Niederschlag wurde abfiltriert, stark zwischen Fließpapier abgepreßt, dann mittels Schwefelwasserstoff zersetzt. Die dabei erhaltene Lösung behandelten wir so, wie es oben für die in gleicher Weise bei Verarbeitung der Hülsen erhaltene Lösung angegeben worden ist. Sie lieferte nach dem Einengen Krystalle, die im Aussehen dem Glutamin glichen; es blieb aber eine starke sirupöse Mutterlauge übrig. Die Krystalle wurden mit Hilfe einer Nutsche, hierauf noch durch Aufstreichen auf eine Tonplatte von der Mutterlauge befreit. Sowohl die Körner des ersten, wie diejenigen des zweiten Entwicklungsstadiums lieferten ein solches Produkt. Die beiden Produkte wurden vereinigt und sodann näher untersucht. Es zeigte sich, daß sie aus einem Gemenge von Glutamin, Tyrosin und Vernin bestanden. Die Trennung dieser Stoffe gelang in folgender Weise: Die Krystalle wurden mit kaltem Wasser be-

handelt, wobei ein starker Rückstand blieb. Dieser Rückstand löste sich in kochendem Wasser; die Lösung lieferte nach dem Erkalten zunächst eine Ausscheidung, die dem Vernin glich; sie wurde rasch abfiltriert, abgepreßt und getrocknet. Das Filtrat lieferte über Nacht eine Ausscheidung, welche Tyrosin, daneben ohne Zweifel auch Vernin einschloß. Wie wir diese beiden Stoffe reinigten und identifizierten, werden wir weiter unten angeben.

Die von dem aus Vernin und Tyrosin bestehenden Rückstande abfiltrierte Lösung wurde, um das darin in kleiner Menge noch enthaltene Vernin zu entfernen, mit Schwefelsäure angesäuert und sodann mit Phosphorwolframsäure versetzt. Der dadurch erzeugte Niederschlag lieferte bei der Zerlegung Vernin in kleiner Menge. Das Filtrat befreiten wir von der überschüssigen Phosphorwolframsäure und von der Schwefelsäure, indem wir es mit Barytwasser alkalisch machten. Nachdem der überschüssige Baryt durch Einleiten von Kohlensäure entfernt worden war, versetzten wir die Flüssigkeit mit Mercurinitrat, wobei ein ziemlich starker Niederschlag entstand. Die bei Zerlegung dieses Niederschlages erhaltene Lösung lieferte nach dem Einengen Krystalle, die im Aussehen vollständig dem Glutamin glichen; doch war ein wenig Tyrosin beigemischt. Wir lösten die Krystalle in einer möglichst geringen Menge kalten Wassers, wobei Tyrosin zurückblieb. Das beim Verdunsten der Lösung wiedergewonnene Produkt zersetzte sich, wie das Glutamin, beim Erhitzen sowohl mit verdünnter Natronlauge wie mit verdünnter Salzsäure unter Abspaltung von Ammoniak; es löste sich nicht in einer wässerigen, kalt gesättigten Lösung von reinem Glutamin, während in einem Kontrollversuche eine annähernd gleiche Substanzmenge sich in der gleichen Menge kalten Wassers löste (unter Hinterlassung einer minimalen Quantität von Tyrosin). Ferner wurde noch konstatiert, daß die wässerige Lösung unseres Produktes in der Wärme Kupferhydroxyd löste und daß aus der lasurblauen Lösung eine im Aussehen dem Glutaminkupfer gleichende schwer lösliche Verbindung sich ausschied. Für eine Analyse reichte das Produkt nicht hin; doch kann dasselbe, auch ohne daß eine Ana-

lyse vorliegt, auf Grund der von uns gemachten Beobachtungen für Glutamin erklärt werden.

Bei Behandlung der glutaminhaltigen Krystallisation mit kaltem Wasser blieb, wie oben erwähnt worden ist, ein aus Vernin und Tyrosin bestehender Rückstand. Eine Trennung dieser beiden, in kaltem Wasser sehr schwer löslichen Stoffe war möglich, weil das Vernin die Eigenschaft hat, aus einer Lösung in heißem Wasser beim Erkalten sehr rasch auszukrystallisieren. Als wir die aus einer Lösung jenes Rückstandes in kochendem Wasser beim Erkalten sich abscheidenden Krystalle rasch abfiltrierten und das so gewonnene Produkt dann noch einmal in der gleichen Weise behandelten, erhielten wir ein von Tyrosin freies Verninpräparat. Dasselbe stimmte im Aussehen, auch unter dem Mikroskop, vollkommen mit einem Verninpräparat unserer Sammlung überein; es schied sich aus einer Lösung in heißem Wasser beim Erkalten sehr schnell in feinen Nadeln aus, die nach dem Abfiltrieren und Trocknen eine atlasglänzende Masse bildeten. Die wässerige Lösung gab mit Silbernitrat eine gallertartige, durchsichtige Fällung; beim Versetzen mit Pikrinsäure gab sie eine aus sehr feinen Nadeln bestehende Ausscheidung. Das in dieser Weise erhaltene Pikrat schmolz gleichzeitig mit dem aus dem Vergleichspräparat auf gleichem Wege erhaltenen pikrinsauren Salze. Die Hälfte des Verninpräparats wurde zirka eine Stunde lang mit $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure gekocht. Ein Teil der dabei erhaltenen Lösung wurde mit Baryumhydroxyd neutralisiert und nach dem Abfiltrieren des Niederschlages mit Fehlingscher Lösung erhitzt, wobei eine Ausscheidung von Kupferoxydul¹⁾ erfolgte. Den Rest jener Lösung machten wir mit Ammoniakflüssigkeit alkalisch und engten ihn sodann im Wasserbade stark ein. Dabei schied sich Guanin aus, das nach dem Abfiltrieren und Auswaschen in verdünnter Salzsäure gelöst wurde. Aus der Lösung krystallisierte salzsaures Guanin in dünnen Nadeln; dieses Produkt gab die Guaninreaktionen. Diese Versuchsergebnisse

¹⁾ Daß das Vernin bei der Spaltung durch verdünnte Säuren neben Guanin eine Glukose liefert, ist von E. Schulze und N. Castoro (Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 460—464) nachgewiesen worden.

beweisen, daß das aus den Samenkörnern erhaltene Produkt Vernin war.

Das in oben beschriebener Weise vom Vernin getrennte, wahrscheinlich aber noch nicht ganz reine Tyrosin wurde in verdünnter Salzsäure gelöst und durch Neutralisation dieser Lösung mit Ammoniak wieder zur Ausscheidung gebracht; es bildete nun feine Krystalle, die in kaltem Wasser sehr schwer löslich waren. Die Krystalle lieferten nicht nur beim Erwärmen mit Millonschem Reagens eine rote Flüssigkeit, sondern gaben auch die von Piria und von Mörner für das Tyrosin angegebenen Reaktionen.

Die von dem aus Glutamin, Tyrosin und Vernin bestehenden Krystallgemenge getrennte Mutterlauge wurde mit Wasser verdünnt, mit Schwefelsäure angesäuert und sodann mit Phosphorwolframsäure versetzt, wobei ein sehr starker Niederschlag entstand. Derselbe lieferte, wie aus den weiter unten gemachten Angaben hervorgeht, bei der Zerlegung Arginin in bedeutender Quantität. Die von diesem Niederschlage abfiltrierte Flüssigkeit versetzten wir zur Entfernung der überschüssigen Phosphorwolframsäure und der Schwefelsäure mit Bleiessig; dem Filtrat vom Bleiniederschlag wurde wieder Mercurinitrat zugefügt. Dabei entstand ein Niederschlag, der bei der Zerlegung Asparagin in kleiner Menge lieferte. Diesem Produkte war etwas Glutamin beigemischt, das sich jedoch durch Abschleimen mit Hilfe der Mutterlauge größtenteils entfernen ließ. Der dabei verbliebene Rückstand wurde aus Wasser umkrystallisiert; die Krystalle stimmten im Aussehen mit Asparagin überein und enthielten Krystallwasser (Unterschied vom Glutamin). Beim Erhitzen sowohl mit verdünnter Salzsäure wie mit Natronlauge wurden sie unter Abspaltung von Ammoniak zersetzt; ihre wässrige Lösung gab mit Mercurinitrat eine Fällung und löste in der Wärme Kupferhydroxyd unter Bildung einer lasurblauen Flüssigkeit. Die Quantität, in der dieses Produkt gewonnen wurde, reichte zur Ausführung einer Analyse nicht hin.

Wie aus den im vorigen gemachten Angaben hervorgeht, konnten wir aus dem Niederschlage, der durch Mercurinitrat in dem wässrigen, durch Versetzen mit Bleiessig gereinigten

Extrakte hervorgebracht wurde, fünf Stickstoffverbindungen isolieren, nämlich Glutamin, Asparagin, Tyrosin, Arginin und Vernin. Von diesen Verbindungen war das Arginin diejenige, welche in größter Quantität erhalten wurde; die vier anderen konnten nur in kleiner Menge gewonnen werden. Dem Filtrat von jenem Niederschlage fügten wir noch etwas Mercurinitrat, dann Natronlauge bis zur schwach alkalischen Reaktion zu, wobei ein starker weißer Niederschlag entstand. Dieser Niederschlag wurde nach dem Abfiltrieren und Auswaschen mittels Schwefelwasserstoff zersetzt, die vom Schwefelquecksilber durch Filtration getrennte Lösung mit Ammoniak neutralisiert und hierauf bis zur Sirupkonsistenz eingeeengt. Der Sirup lieferte beim Erkalten eine Ausscheidung, die sich aber nur unvollständig von der Mutterlauge trennen ließ. Wir erhitzen den Sirup daher mit absolutem Alkohol und fügten der Lösung sodann etwas konzentrierte Ammoniakflüssigkeit zu. Die so entstandene, vom rückständigen Sirup abgegossene Lösung gab beim Eindunsten eine Ausscheidung, die mit Hilfe einer Tonplatte von der Mutterlauge getrennt und hierauf aus Wasser umkrystallisiert wurde; ein Teil dieses Produkts wurde auch aus einem Gemisch von heißem Alkohol und Ammoniakflüssigkeit umkrystallisiert. Die in dieser Weise erhaltene Substanz stimmte im Aussehen mit unreinem Leucin überein, verhielt sich aber beim Erhitzen im Röhrchen nicht wie Leucin. Sie war stickstoffhaltig, bestand aber allem Anschein nach aus einem Gemenge mehrerer Stoffe. Die wässerige Lösung lieferte beim Erhitzen mit Kupferhydroxyd eine in Wasser schwer lösliche Kupferverbindung; doch schien auch die bei Zerlegung dieser Kupferverbindung mittels Schwefelwasserstoff erhaltene Substanz nicht einheitlich zu sein.

Die von dem zweiten Mercurinitratniederschlage abfiltrierte Flüssigkeit wurde mittels Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit, dann mit Baryumhydroxyd neutralisiert, hierauf im Wasserbade stark eingeeengt. Nachdem sie mit Hilfe von Schwefelsäure vom Baryt befreit worden war, versetzten wir sie mit Phosphorwolframsäure. Die dadurch erzeugte Fällung vereinigten wir mit dem Niederschlage, der durch Phosphorwolframsäure

in der bei Zerlegung des ersten Mercurinitratniederschlags erhaltenen Lösung hervorgebracht worden war (cf. die oben gemachte Angabe). Die vereinigten Niederschläge wurden sodann in bekannter Weise behandelt. Aus der dabei erhaltenen, mit Salpetersäure neutralisierten Basenlösung wurden durch Silbernitrat Alloxurbasen gefällt; die bei Zerlegung des Niederschlags erhaltene Flüssigkeit gab mit ammoniakalischem Silbernitrat eine in Ammoniak unlösliche Fällung. Aus dem Filtrat von jenem Niederschlage wurden nach bekanntem Verfahren durch Silbernitrat und Barytwasser Histidin und Arginin gefällt. Die Histidinfraction des Niederschlags, verarbeitet nach der von Kossel und Patten (*loc. cit.*) gegebenen Vorschrift, lieferte in kleiner Menge ein krystallinisches Produkt, das jedoch kein Histidinchlorid war; die Mutterlauge gab aber die von Pauli (*loc. cit.*) für Histidin angegebene Reaktion, so daß das Vorhandensein einer sehr geringen Menge dieser Base anzunehmen ist. Die Argininfraction des Niederschlags lieferte Arginin in reichlicher Menge, wir erhielten bei Verarbeitung dieser Fraction nahezu 4,0 g Argininnitrat. Letzteres wurde in die Kupferverbindung übergeführt. Diese Verbindung krystallisierte in der charakteristischen Form; der Schmelzpunkt der Krystalle entsprach der für das Argininkupfernitrat gemachten Angabe (112—114°). Bei Bestimmung des Kupfergehalts dieser Verbindung wurden folgende Resultate erhalten.

0,3790 g Substanz gaben 0,0501 g CuO = 10,54% Cu.

Die Theorie verlangt 10,76% Cu.

Die oben angegebene Quantität von Argininnitrat, in welcher ungefähr 2,84 g Arginin enthalten waren, wurde bei Verarbeitung von ca. 2 kg der frischen Samenkörner erhalten; in diesem Quantum können ca. 450 g Trockensubstanz sich vorgefunden haben.¹⁾ Die Ausbeute an Arginin betrug demnach ca. 0,63% vom Trockengewicht des Ausgangsmaterials.

Die im Filtrat vom Argininsilberniederschlage noch erhaltenen Basen wurden, nachdem dieses Filtrat vom Silber und

¹⁾ Der Trockensubstanzgehalt der frischen Samenkörner schwankte von 19—24%.

vom Baryum befreit worden war, wieder mit Phosphorwolframsäure gefällt. Den Niederschlag zerlegten wir durch Baryumhydroxyd, säuerten die dabei erhaltene Lösung mit Salzsäure an und verdunsteten sie zur Trockene. Den trockenen Rückstand behandelten wir zuerst in der Kälte, dann bei Wasserbadhitze mit Weingeist. Den vom Rückstande getrennten Auszug versetzten wir mit alkoholischer Mercurichloridlösung. Die dabei entstandene Fällung wurde nach einigen Tagen abfiltriert, sodann aus heißem Wasser umkrystallisiert, hierauf durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Schwefelquecksilber durch Filtration getrennte Lösung lieferte einen anfangs sirupösen, später krystallinisch werdenden Verdampfungsrückstand. Derselbe wurde im Vakuumexsikkator ausgetrocknet, dann mit kaltem wasserfreiem Alkohol behandelt. Dabei ging salzsaures Cholin in Lösung. Die Lösung wurde zur Reinigung eingedunstet, der gut getrocknete Verdampfungsrückstand wieder mit kaltem wasserfreiem Alkohol behandelt. Die dabei resultierende Lösung gab mit alkoholischer Platinchloridsolution eine gelbe Fällung, welche abfiltriert und in Wasser gelöst wurde. Beim langsamen Verdunsten lieferte diese Lösung orangerote Tafeln, die das Aussehen des Cholinplatinchlorids besaßen. Doch war dieses Produkt offenbar noch nicht ganz rein; denn die Krystalle gaben beim Glühen 32,2% Platin, während der Platingehalt des Cholinplatinchlorids bekanntlich nur 31,6% beträgt. Wir zerlegten daher das Platindoppelsalz mit Schwefelwasserstoff, dunsteten die vom Schwefelplatin getrennte Lösung zur Trockene ein und behandelten das dabei erhaltene Produkt noch einmal mit wasserfreiem Alkohol. Die alkoholische Lösung wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand in Wasser gelöst. Das durch Versetzen dieser Lösung mit Goldchlorid dargestellte Chloraurat schmolz gleichzeitig mit Cholingoldchlorid-Präparaten anderer Herkunft. Da ferner das in zerfließlichen Nadeln krystallisierende salzsaure Salz der Base die Reaktionen des Cholinchlorids gab und insbesondere auch nach Zusatz von Soda durch Kaliumtrijodid gefällt wurde, so kann kaum bezweifelt werden, daß Cholin vorlag — wobei noch darauf hinzuweisen ist, daß das Vorhandensein dieser Base

in reifen Samen von *Pisum sativum* früher schon von uns nachgewiesen worden ist.

Bei Behandlung des bei Zerlegung der Quecksilberdoppelsalze erhaltenen Chloridgemenges mit wasserfreiem Alkohol blieb ein Rückstand, der sich leicht in Wasser löste; die Lösung gab beim Verdunsten kleine glänzende Tafeln, die das Aussehen des salzsauren Trigonellins besaßen. Das daraus in oben schon angegebener Weise dargestellte basische Chloraurat schmolz bei 186°. Eine Goldbestimmung gab für dieses Doppelsalz folgendes Resultat:

0,1697 g Substanz (bei 100° getrocknet) gaben 0,0641 g = 37,77% Au.

Die Theorie verlangt für das basische Chloraurat des Trigonellins einen Goldgehalt von 37,7%. Diese Versuchsergebnisse beweisen, daß Trigonellin vorlag. Auch diese Base ist von uns in reifen Samen von *Pisum sativum* nachgewiesen worden.

Wie aus den oben gemachten Angaben zu ersehen ist, haben wir Cholin und Trigonellin aus dem Filtrat vom Argininsilberniederschlag isoliert, und zwar wurden die in diesem Filtrat enthaltenen Basen in salzsaure Salze übergeführt, letztere sodann getrocknet und hierauf mit Weingeist extrahiert, wobei Cholinchlorid und Trigonellinchlorid in Lösung gingen. Der in Weingeist unlösliche Teil des Chloridgemenges schloß neben anorganischen Salzen auch organische Substanzen ein. Unter den letzteren konnte Lysin sich vorfinden. Es war aber möglich, daß ein Teil des Lysins in den weingeistigen Extrakt übergegangen war; dieser Teil mußte sich in dem Verdampfungsrückstand der Flüssigkeit vorfinden, die nach Ausfällung von Cholin und Trigonellin mittels Mercurichlorid übrig blieb. Wir vereinigten diese beiden, auf Lysin zu prüfenden Rückstände, lösten sie in Wasser und versetzten die Lösung zuerst mit Mercurichlorid, dann mit Barytwasser. Der dabei entstandene Niederschlag wurde mittels Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Schwefelquecksilber sodann mit Schwefelsäure angesäuert und mit Phosphorwolframsäure versetzt. Den durch dieses Reagens hervorgebrachten Niederschlag zerlegten wir mittels Baryumhydroxyd. Die dabei erhaltene Lösung wurde,

nachdem sie mit Hilfe von Kohlensäure vom Baryt befreit worden war, stark eingeengt und sodann mit einer alkoholischen Pikrinsäurelösung neutralisiert. Sie lieferte nun ein in Wasser schwer lösliches Pikrat, welches das Aussehen des Lysinpikrats besaß; dasselbe schmolz, nachdem es aus Wasser umkrystallisiert worden war, gleichzeitig mit einem Lysinpikratpräparat unserer Sammlung. Bei der Zerlegung mittels Salzsäure und Äther lieferte dieses Pikrat ein in Methylalkohol lösliches Chlorid. Aus diesen Versuchsergebnissen ist zu schließen, daß auch Lysin vorhanden war.

Aus den im vorigen mitgeteilten Ergebnissen unserer Versuche ist zu schließen, daß in den unreifen Samen von *Pisum sativum* Asparagin, Glutamin, Tyrosin, Arginin, Lysin, Histidin, Alloxurbasen, Vernin, Cholin und Trigonellin sich vorfanden. Daß außer Tyrosin noch andere Monoaminosäuren vorhanden waren, muß für wahrscheinlich erklärt werden; es gelang uns aber nicht, Leucin oder Valin zu isolieren. Auch der Nachweis von Tryptophan gelang nicht.¹⁾ Die meisten der genannten Stickstoffverbindungen wurden von uns nur in sehr kleinen Quantitäten erhalten. In größerer Menge ließ sich nur Arginin gewinnen. Wie oben schon mitgeteilt wurde, erhielten wir bei Verarbeitung eines Quantums frischer Samen, das ca. 450 g Trockensubstanz einschloß, nahezu 4,0 g Argininnitrat oder ca. 2,84 g Arginin. Da wir aber bei Abscheidung des Arginins nicht so verfahren, daß nicht Substanzverluste eingetreten sein können, so war die im Untersuchungsmaterial vorhandene Argininquantität ohne Zweifel bedeutend größer, als die zur Abscheidung gebrachte Menge.

¹⁾ Für die Prüfung auf Tryptophan verwendeten wir einen wässrigen Extrakt aus ca. 80 g Samenkörnern, die gleich nach der Ernte mit absolutem Alkohol übergossen, später (nach dem Abgießen der alkoholischen Lösung) bei 35–40° getrocknet, hierauf fein zerrieben worden waren. Der durch Versetzen mit Bleiessig gereinigte, sodann mit Schwefelsäure angesäuerte Extrakt gab beim Versetzen mit Quecksilbersulfat keine Fällung. Bei mehrtägigem Stehen schied sich allerdings ein sehr geringer Niederschlag aus; die bei Zerlegung dieses Niederschlages mittels Schwefelwasserstoff erhaltene Lösung gab aber nicht die Tryptophan-Reaktion mit Glyoxylsäure und Schwefelsäure.

Mit Sicherheit kann behauptet werden, daß in den unreifen Samenkörnern eine weit größere Argininmenge sich vorfand als in den Samenhülsen. Denn wir erhielten, wie oben schon angegeben worden ist, aus 3 kg frischer Hülsen — einer Quantität, die etwa 600 g Trockensubstanz enthalten haben kann — kaum 0,1 g Argininnitrat; noch etwas geringer war die Argininmenge, die aus den dem zweiten Entwicklungsstadium angehörenden Samenhülsen gewonnen wurde (trotzdem daß wir im letzteren Falle Substanzverluste möglichst zu vermeiden suchten). Durch dieses Resultat wird aber die schon im Jahr 1905 bei Untersuchung unreifer Früchte von *Pisum sativum* von uns gemachte Beobachtung bestätigt; auch damals fanden wir in den Samenkörnern weit mehr Arginin als in den Samenhülsen.

Außer den oben genannten Stoffen können selbstverständlich noch andere, nicht proteinartige Stickstoffverbindungen in den von uns untersuchten Samen enthalten gewesen sein. Die in diesen Samen auf solche Verbindungen fallende Stickstoffmenge war ja recht beträchtlich; bei den im zweiten Entwicklungsstadium sich befindenden Samen, welche vorzugsweise als Material für unsere Versuche dienten, betrug jene Stickstoffmenge etwas mehr als 1% der Samentrockensubstanz: noch größer, nämlich = 2,4—2,5%, war sie bei den noch sehr kleinen Körnern des ersten Entwicklungsstadiums. Es ist nicht anzunehmen, daß dieser ganze Betrag durch die von uns isolierten nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen gedeckt wird; man kann es im Gegenteil für höchst wahrscheinlich erklären, daß neben denselben noch andere Stoffe solcher Art sich vorfanden, die sich bisher dem Nachweis entzogen. Daß darunter auch Polypeptide vorhanden waren, muß für möglich erklärt werden.

Von der Stickstoffmenge, die in den Samenkörnern des zweiten Entwicklungsstadiums auf nichtproteinartige Stickstoffverbindungen fiel, ging mehr als die Hälfte, nämlich ca. 60%, in den durch Phosphorwolframsäure in einem proteinfreien Extrakt hervorgebrachten Niederschlag ein. Dies erklärt sich aus dem großen Arginingehalt dieser Samen. Doch ist es sehr wahrscheinlich, daß in den Phosphorwolframsäureniederschlag außer Arginin und den neben letzterem nachgewiesenen Basen

(Lysin, Histidin usw.) auch noch andere Stoffe eingegangen waren.

In den reifen Samen von *Pisum sativum* betrug die auf nichtproteinartige Verbindungen fallende Stickstoffmenge nur 0,39% der Samentrockensubstanz. Wir konnten aus solchen Samen Arginin, Cholin und Trigonellin darstellen. Bei Ausführung der bezüglichen Versuche verfahren wir ganz ebenso, wie bei Darstellung der genannten Basen aus den unreifen Samen. Aus einem Quantum reifer Samen, welches ca. 480 g Trockensubstanz einschloß, erhielten wir 1,59 g Arginnitrat (= 1,128 g Arginin). Das Nitrat bildete weiße Krystalle; als die wässerige Lösung dieser Krystalle mit Kupfercarbonat erhitzt wurde, entstand eine tiefblaue Flüssigkeit, aus der beim Erkalten Argininkupferniträt in der charakteristischen Form auskrystallisierte (der Schmelzpunkt der durch Umkrystallisieren gereinigten Verbindung lag bei 112°). Aus obigen Zahlen berechnet sich der Arginingehalt der Samentrockensubstanz auf 0,23 %, während die Trockensubstanz der unreifen Samen ca. 0,63% Arginin lieferte. Berechnet man unter Zugrundelegung dieser Zahlen die in 100 Stück Samen enthaltene Argininmenge, so gelangt man zu folgendem Ergebnis:

100 Stück unreife Samen	lieferten	0,115 g Arginin.
100 „ reife „ „ „	„ „ „	0,076 „ „

Aus diesen Zahlen, die freilich nicht als genau zu bezeichnen sind,¹⁾ ist zu folgern, daß beim Ausreifen der Samen das Arginin an Quantität abgenommen hatte. Immerhin war der Arginingehalt der reifen Samen noch ein relativ beträchtlicher (früher von uns untersuchte Erbsensamen enthielten weniger Arginin). Wir fanden einen beträchtlichen Arginingehalt auch in reifen Samen von *Lupinus luteus*;²⁾ doch zeigten

¹⁾ Es handelt sich ja hier nicht um genaue Bestimmung des Argininhalt der Samen, sondern nur um Bestimmung der Ausbeute. Wie oben schon erwähnt worden ist, fand bei Abscheidung des Arginins aus den unreifen Samen wahrscheinlich ein etwas größerer Substanzverlust statt, als bei Darstellung dieser Base aus den reifen Samen; die Differenz zwischen dem Arginingehalt der unreifen und der reifen Samen war daher vermutlich noch etwas größer, als oben angegeben worden ist.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 457—459.

sich hier nicht unbedeutende Verschiedenheiten zwischen dem Arginingehalt verschiedener Muster dieser Samenart. Es scheint also, daß beim Reifen der Samen ein bald größerer, bald geringerer Teil des in den unreifen Samen vorhandenen Arginins der Verwendung zur Proteinsynthese entgeht.

Cholin und Trigonellin wurden aus den nach früher beschriebenem Verfahren erhaltenen Quecksilberdoppelsalzen dargestellt. Die bei Zerlegung dieser Doppelsalze mittels Schwefelwasserstoff erhaltene Lösung wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand nach dem Austrocknen im Vakuumexsikkator mit wasserfreiem Alkohol behandelt. Dabei ging Cholinchlorid in Lösung, während salzsaures Trigonellin zurückblieb. Die Lösung wurde wieder eingedunstet, der Verdampfungsrückstand nach völligem Austrocknen wieder mit wasserfreiem Alkohol behandelt; dabei blieb noch ein wenig Trigonellinchlorid zurück, das wir mit dem zuerst erhaltenen vereinigten. Das Gewicht dieses Produktes betrug 0,233 g; der Trigoningehalt der Samentrockensubstanz berechnet sich daraus auf ca. 0,037 %. Das in die alkoholische Lösung übergegangene Cholinchlorid wurde in das Platindoppelsalz übergeführt. Wir erhielten 0,450 g dieses Doppelsalzes = 0,177 g Cholin. Der Cholingehalt der Samentrockensubstanz berechnet sich daraus auf ca. 0,036 %. Es sei hier noch daran erinnert, daß das Vorkommen von Cholin und Trigonellin in reifen Erbsensamen von uns früher schon mehrfach nachgewiesen worden ist.

Diskussion der im Abschnitt I mitgeteilten Versuchsergebnisse.

Aus den im ersten Teile des Abschnitts I gemachten Angaben ist zu schließen, daß in den reifenden Samen die ihnen aus den andern Pflanzenteilen zufließenden nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen in der Regel rasch zur Proteinsynthese verwendet werden. Doch findet man in solchen Samen stets einen Rest jener Verbindungen vor; seine Quantität ist in ganz jungen Samenkörnern relativ groß, später aber geringer. Dieser Rest kann neben Stoffen, welche unbrauchbar für die Proteinsynthese sind, auch Verbindungen einschließen, die für diese

Synthese langsamer verwendet werden und daher in größerer Menge in den Samen zurückbleiben als andere, die nach ihrem Eintritt in die Samen rasch umgewandelt werden. Um festzustellen, welche Stickstoffverbindungen vorzugsweise jenem Zwecke dienen, muß man jenen Rest hinsichtlich seiner Zusammensetzung mit dem aus andern Pflanzenteilen den Samen zufließenden Gemenge von Stickstoffverbindungen vergleichen. Die Möglichkeit zur Ausführung einer solchen Untersuchung ist gegeben durch die Tatsache, daß bei den Leguminosen die Samenhülsen als Reservestoffbehälter dienen und daß aus ihnen bedeutende Quantitäten von Stickstoffverbindungen in die reifenden Samen übergehen.

Aus den Samenhülsen von *Pisum sativum* konnten wir außer einer ansehnlichen Quantität von Asparagin kleine Mengen von Arginin, Histidin und Tryptophan darstellen; auch Monoaminofettsäuren waren vorhanden. Auch in den Samenhülsen von *Phaseolus vulgaris* sind Asparagin, Tyrosin, Monoaminofettsäuren, Arginin und Tryptophan nachgewiesen worden. Es ist darauf hinzuweisen, daß die gleichen Stoffe auch als Produkte des Eiweißabbaues in den Keimpflanzen der Leguminosen auftreten und daß sie hier den im Wachstum begriffenen Pflanzenteilen, in denen die Neubildung von Proteinen erfolgt, zugeführt werden.

Das in den reifenden Samen von *Pisum sativum* sich findende Gemenge nichtproteinartiger Stickstoffverbindungen weicht in bezug auf seine Zusammensetzung stark von demjenigen ab, das in den Samenhülsen enthalten ist. Zur Begründung dieses Ausspruchs sei zunächst darauf hingewiesen, daß wir Glutamin, Tyrosin, Lysin und Vernin zwar aus den Samenkörnern, nicht aber aus den Hülsen zu isolieren vermochten. Aus dem letzteren Resultat läßt sich freilich nicht mit Sicherheit auf ein völliges Fehlen der genannten Stoffe in den Hülsen schließen; denn es ist möglich, daß diese Stoffe, die auch in den Samen nur in kleiner Menge enthalten waren, in den Hülsen in noch geringerer Quantität sich vorfanden und daß sie infolge davon aus letzteren nicht isoliert werden konnten. Jedenfalls aber ist die Quantität dieser Stoffe in den Samen-

körnern und in den Hülsen eine ungleiche gewesen. Mit noch größerer Sicherheit gilt dies für einige andere Stickstoffverbindungen. Während wir aus den Hülsen eine ansehnliche Menge von Asparagin darzustellen vermochten, erhielten wir aus den Samen dieses Amid nur in sehr kleiner Menge. Die Ausbeute an Arginin war bei den Samenkörnern mindestens 40mal so groß, wie bei den Hülsen. Es unterliegt also keinem Zweifel, daß das in den unreifen Samen sich vorfindende Gemenge nichtproteinartiger Stickstoffverbindungen, wenn es auch vielleicht ganz die gleichen Stoffe einschließt, wie das in den unreifen Hülsen enthaltene Gemenge, doch von letzterem in bezug auf die quantitative Zusammensetzung sehr stark abweicht.

Diese Erscheinung läßt sich durch die schon oben ausgesprochene Annahme erklären, daß die Stickstoffverbindungen, welche als Material für die Proteinsynthese den reifenden Samen zufließen, in den letzteren teils schneller, teils langsamer für diese Synthese verwendet werden. Ist dies der Fall, so muß in dem Rest solcher Verbindungen, den man in den unreifen Samen neben Proteinen noch vorfindet, zwischen den einzelnen Bestandteilen ein ganz anderes Mengenverhältnis obwalten, als in den dem Samen zugeflossenen Stoffmenge. Der sehr niedrige Gehalt der unreifen Samen an Asparagin läßt sich z. B. durch die Annahme erklären, daß gerade dieses Amid rasch zur Proteinsynthese verwendet wird. Es ist ferner möglich, daß die Hülsen neben Asparagin ein wenig Glutamin enthalten; gesetzt nun, daß letzteres in den Samen weniger schnell umgewandelt wird, als das Asparagin, so kann es in solchem Grade sich anhäufen, daß sein Nachweis möglich ist.

Vielleicht aber tritt beim Zustandekommen der besprochenen Erscheinung noch eine andere Ursache in Wirkung; es ist möglich, daß die in den reifenden Samen stattfindenden Synthesen auch zur Bildung gewisser nichtproteinartiger Stickstoffverbindungen führen. Für eine solche Annahme scheint manches zu sprechen. So muß es z. B. im Hinblick auf den höchst geringen Arginingehalt der Hülsen für fraglich erklärt werden, ob die relativ große Argininmenge, die in den unreifen Samen sich vorfindet, ausschließlich den Hülsen entstammt;

man scheint nach einer andern Argininquelle sich umsehen zu müssen. Doch liegen die Verhältnisse nicht so, daß man mit Bestimmtheit eine Synthese von Arginin in den Samen anzu-nehmen hat. Denn vielleicht werden die aus den Blättern und Stengeln den reifenden Früchten zufließenden Stickstoffverbindungen nicht sämtlich vor ihrem Eintritt in die reifenden Samen Bestandteile der Hülsen; es ist im Gegenteil möglich, daß sie zum Teil durch gewisse Gefäßbündel den Samen direkt zugeführt werden. Gesetzt nun, daß das auf letzterem Wege den Samen zufließende Stoffgemenge reicher an Arginin ist, als das in den Hülsen sich vorfindende Gemenge von Stickstoffverbindungen, so könnte daraus der hohe Arginingehalt der unreifen Samen erklärt werden.

Wie aus diesen Darlegungen hervorgeht, läßt sich eine allen Anforderungen genügende Erklärung für den sehr ungleichen Gehalt der unreifen Samen und Hülsen von *Pisum sativum* an gewissen nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen zurzeit nicht geben. Jedenfalls aber kann diese Erscheinung, die auch, freilich in weit geringerem Grade, bei den reifenden Früchten von *Phaseolus vulgaris* hervorgetreten ist, Interesse für sich beanspruchen; sie wird bei der weiteren Erforschung der Proteinsynthese in den reifenden Samen berücksichtigt werden müssen.

II. Untersuchung milchreifer Samenkörner des Weizens (*Triticum vulgare*).

Durch eine Untersuchung, die zum Teil in unserem Laboratorium ausgeführt wurde, hat N. Nedokutschajew ¹⁾ nachgewiesen, daß in den Samen des Weizens während des Reifens das Verhältnis zwischen den auf Protein und auf Nichtprotein fallenden Stickstoffmengen sich zugunsten des Proteins verschiebt. Als Untersuchungsobjekt diente Sommerweizen. Nachdem die Blütezeit beendet war und die Bildung der Körner begonnen hatte, wurden die letzteren in regelmäßigen Zwischenräumen von 5–7 Tagen gesammelt und hierauf sofort bei 60°

¹⁾ Landwirtschaftl. Versuchsstationen, Bd. LVI, S. 303.

getrocknet. So gelangten denn die Samenkörner in 6 aufeinanderfolgenden Entwicklungsstadien zur Untersuchung; das letzte dieser Stadien entsprach der «Gelbreife» der Körner. Für die Verteilung des Stickstoffs auf Protein und auf Nichtprotein wurden folgende Zahlen gefunden:

	Stickstoff	
	im Protein	im Nichtprotein
I.	66 %	34 %
II.	76 %	24 %
III.	88 %	12 %
IV.	85 %	15 %
V.	85 %	15 %
VI.	90 %	10 %

Bemerkenswert ist, daß in den letzten 4 Entwicklungsstadien das Verhältnis zwischen den auf Protein und auf Nichtprotein fallenden Stickstoffmengen nur geringe Veränderungen erfahren hat.

Die Bestimmung der auf Protein und Nichtprotein fallenden Stickstoffquantitäten geschah nach der von Stutzer angegebenen Methode. Doch hat Nedokutschajew später für diese Bestimmungen auch die von Laszcynski¹⁾ angegebene Methode benutzt. Dabei ergaben sich kleine Differenzen von den nach Stutzers Verfahren erhaltenen Zahlen; hinsichtlich dieser Differenzen verweisen wir auf die zitierte Abhandlung.

Aus den Ergebnissen seiner Versuche berechnete Nedokutschajew auch noch die Stickstoffmengen, die im ersten und im letzten Entwicklungsstadium in einem Weizenkorn auf Protein und auf Nichtprotein fielen. Dabei erhielt er folgende Zahlen:

	Stickstoff	
	im Protein	im Nichtprotein
I.	0,1743 mg	0,0892 mg
VI.	0,9684 »	0,1091 »

In einem Weizenkorn fand sich also im Stadium VI etwas mehr Nichtproteinstickstoff vor, wie im Stadium I. Diese Zahlen führen im Verein mit denjenigen der ersten Tabelle, nach welcher das Mengenverhältnis zwischen Proteinstickstoff

¹⁾ Landwirtschaftl. Versuchsstationen, Bd. LVIII, S. 275.

und Nichtproteinstickstoff in den 4 letzten Stadien nur unbeträchtliche Differenzen zeigte, zu der Schlußfolgerung, daß auch in reifenden Weizenkörnern eine beträchtliche Anhäufung von nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen nicht erfolgt; man muß annehmen, daß auch hier die als Material für die Proteinsynthese den reifenden Körnern von außen zufließenden Stickstoffverbindungen eine rasche Verwendung für jene Synthese fanden.

Versuche, durch welche Nedokutschajew über die Qualität der in den unreifen Weizenkörnern enthaltenen nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen Aufschluß zu gewinnen versuchte, hatten nur geringen Erfolg. In einem wässerigen, durch Versetzen mit Bleiessig gereinigten Extrakte brachte Mercurinitrat eine ziemlich starke Fällung hervor, doch konnte aus der bei Zerlegung dieser Fällung erhaltenen Lösung Asparagin nicht in Krystallen gewonnen werden. Die Abscheidung von Monoaminosäuren aus einem alkoholischen Extrakt gelang nicht, vielleicht nur wegen des bedeutenden Kohlenhydratgehalts dieses Extraktes. Aus dem Phosphorwolframsäureniederschläge wurden Basen gewonnen, die im Verhalten gegen Fällungsmittel sich wie Arginin und Histidin verhielten; die Reindarstellung dieser Basen gelang aber nicht, vielleicht nur deshalb, weil die zur Verfügung stehende Materialmenge relativ gering war. Nachgewiesen wurde das Vorhandensein von Alloxurbasen.

Wir untersuchten in den Jahren 1905 und 1909 milchreife Weizenkörner, welche leicht in großer Quantität zu beschaffen sind. Im Jahre 1905 hatten wir ca. 10 Kilo solcher Körner zur Verfügung. Einige Kilo dieser Körner wurden in ganz frischem Zustande möglichst fein zerkleinert und hierauf mit Wasser extrahiert; der Rest der Körner wurde in 95%igen Alkohol geworfen. Den wässerigen Extrakt versetzten wir, nachdem die durch Bleiessig fällbaren Substanzen entfernt worden waren, mit Mercurinitrat, wobei eine ziemlich starke Fällung entstand. Aus der bei Zerlegung dieser Fällung mittels Schwefelwasserstoff erhaltenen Lösung ließ sich aber kein Asparagin gewinnen. Auch vermochten wir aus einem solchen Extrakte Arginin nicht darzustellen. Dagegen konnte das Vor-

handensein einer kleinen Quantität von Monoaminosäuren nachgewiesen werden. Zur Darstellung dieser Stoffe verwendeten wir die unter Alkohol aufbewahrten Samenkörner. Letztere wurden nach dem Abgießen der alkoholischen Lösung getrocknet, hierauf fein zerrieben und nun mit Alkohol von ca. 90 Volumprozent in der Wärme extrahiert. Der Extrakt wurde der Destillation unterworfen, der dabei verbliebene Rückstand in Wasser aufgenommen, die Flüssigkeit mit Bleiessig versetzt. Das Filtrat vom Bleiniederschlag befreiten wir mittels Schwefelwasserstoff vom Blei und dunsteten es sodann zum Sirup ein. Mit diesem Produkt vereinigten wir den Sirup, der in ganz gleicher Weise aus der von den Körnern abgegossenen alkoholischen Flüssigkeit erhalten worden war (es mußte für möglich erklärt werden, daß der auf die milchreifen Körner gegossene Alkohol, der durch das in diesen Körnern enthaltene Wasser verdünnt wurde, eine kleine Menge von Aminosäuren in Lösung gebracht hatte). Dann behandelten wir diesen Sirup, welcher Kohlenhydrate in reichlicher Menge enthielt, mit Alkohol und Salzsäure nach der Vorschrift von E. Fischer, um die darin sich vorfindenden Monoaminosäuren in Ester überzuführen. Diese Ester wurden sodann mittels Äther extrahiert und später der Destillation im Vakuum unterworfen. Bei der Verseifung lieferten sie ungefähr 0,5 g eines Produkts, das nach seinem Verhalten für ein Gemenge von Monoaminofettsäuren (Leucin und Valin) erklärt werden konnte.

Die im Jahre 1909 zur Untersuchung gelangten milchreifen Weizenkörner, von denen wir einige Kilogramm zur Verfügung hatten, wurden in frischem Zustande möglichst fein zerkleinert, dann bei ca. 50° mit Wasser extrahiert. Den Extrakt befreiten wir von den durch Bleiessig fällbaren Stoffen und teilten ihn sodann in 2 Hälften; die eine wurde mit Mercurinitrat, die zweite, nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure und darauffolgender Filtration, mit Phosphorwolframsäure versetzt. Die bei Zerlegung des Mercurinitratniederschlags erhaltene Lösung lieferte auch in diesem Falle kein Asparagin. Wir suchten dieselbe nun noch einer Reinigung zu unterwerfen, indem wir sie mit Phosphorwolframsäure versetzten und den

durch dieses Reagens erzeugten Niederschlag durch Filtration entfernten; das Filtrat versetzten wir, nachdem es von der überschüssigen Phosphorwolframsäure mit Hilfe von Bleiessig befreit worden war, wieder mit Mercurinitrat; auch der jetzt durch dieses Reagens erhaltene Niederschlag lieferte bei der Zerlegung kein Asparagin.

Die bei Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlages erhaltene, mit Salpetersäure neutralisierte Basenlösung gab mit Silbernitrat eine Fällung, die allem Anschein nach Alloxurbasen enthielt. Aus dem Filtrat suchten wir nach bekanntem Verfahren durch Fällung mit Silbernitrat und Barytwasser Histidin und Arginin zu gewinnen. Die Histidinfraktion des Niederschlages war an Menge höchst gering und wurde daher nicht weiter untersucht. Aus der an Quantität etwas größeren Argininfraktion vermochten wir diese Base nicht zu isolieren. Die bei Zerlegung dieser Fraktion erhaltene, mit Salpetersäure neutralisierte Lösung lieferte beim Verdunsten keine Krystalle von Argininnitrat. Wir erwärmten die Lösung nun mit reinem Kupfercarbonat, wobei eine tiefblaue Flüssigkeit entstand, doch gelang es nicht, aus derselben Krystalle von Arginkupferniträt zu gewinnen. Die mittels Schwefelwasserstoff wieder vom Kupfer befreite Lösung gab jedoch mit Phosphormolybdänsäure, Kaliumwismutjodid und Nessler'schem Reagens Niederschläge, wie sie durch diese Reagenzien in einer Argininnitratlösung hervorgerufen werden.

Wie oben erwähnt worden ist, brachte Phosphorwolframsäure in der bei Zerlegung des Mercurinitratniederschlages erhaltenen Lösung eine Fällung hervor. Da diese Fällung Arginin einschließen konnte, so haben wir sie auf diese Base untersucht; wir vermochten letztere aber auch in diesem Falle nicht zu isolieren.

Bei dem Versuche, aus unreifen Weizenkörnern Asparagin und Hexonbasen darzustellen, hatten wir also ebenso geringen Erfolg wie Nedokutschajew. Dagegen konnten wir aus solchen Körnern Monoaminosäuren gewinnen; die Ausbeute an diesen Stoffen war aber äußerst gering. Es ist nun noch zu erwähnen, daß wir ein Produkt eigentümlicher Art aus der alkoholischen

Lösung erhielten, die sich beim Aufbewahren der milchreifen Körner unter Alkohol gebildet hatte. Durch den Alkohol, der selbstverständlich den größten Teil des in jenen Körnern enthaltenen Wassers aufgenommen hatte, war neben Kohlenhydraten auch eine proteinartige Substanz gelöst worden. Als wir jene alkoholische Lösung, nachdem sie von den Körnern abfiltriert worden war, bei gelinder Wärme in einer Schale eindunsteten und den dabei erhaltenen Verdampfungsrückstand mit kaltem Wasser behandelten, blieb ein grünlich gefärbter Rückstand,¹⁾ der an der Luft zu einer harten, zerreiblichen Masse austrocknete. Er löste sich langsam in heißem verdünntem Alkohol. Auch kalte, stark verdünnte Natronlauge wirkte lösend; in der Lösung entstand bei der Neutralisation eine Fällung. Der Stickstoffgehalt dieses Produktes, bestimmt nach dem Verfahren von Kjeldahl, betrug im Mittel 12,25%. Der Phosphorsäuregehalt des Produktes betrug 0,40% (nach der Art seiner Darstellung kann dasselbe Phosphatide eingeschlossen haben). Um zu prüfen, ob diese Substanz die Spaltungsprodukte der Proteine lieferte, haben wir ca. 80 g davon mit verdünnter Schwefelsäure (1 Teil konzentrierte Säure und 3 Teile Wasser) 10 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht.²⁾ Nachdem die erkaltete Flüssigkeit mit Hilfe von Baryt von einem Teile der Schwefelsäure befreit worden war, wurde sie mit Phosphorwolframsäure versetzt. Den dabei erhaltenen Niederschlag verarbeiteten wir nach bekanntem Verfahren. Er lieferte Arginin (nachgewiesen durch Überführung in Argininkupfernitrat und Bestimmung des Schmelzpunktes dieser Verbindung). Auch Histidin und Lysin waren allem Anschein nach vorhanden. Doch sind sie, da ihre Quantität nur gering war, nicht mit Sicherheit identifiziert worden. Dem Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlage wurde Barytwasser bis zur alkalischen Reaktion zugesetzt. Die vom Niederschlage abfiltrierte Flüssigkeit lieferte, nachdem sie stark eingengt worden war,

¹⁾ Wahrscheinlich schloß dieser Rückstand ein wenig Chlorophyll ein und war infolge davon grünlich gefärbt.

²⁾ Beim Auflösen dieser Substanz in heißer Schwefelsäure blieb ein dunkel gefärbter, anscheinend aus Fett bestehender Rückstand.

eine aus Tyrosin bestehende Krystallisation. Die Krystalle besaßen nicht nur das Aussehen des Tyrosins, sondern gaben auch alle Reationen dieser Aminosäure. Das Filtrat vom Tyrosin wurde zum Sirup eingedunstet, letzteres sodann mit heißem Alkohol unter Zusatz von etwas konzentrierter Ammoniakflüssigkeit behandelt. Die dabei entstandene, durch Filtration vom Rückstande getrennte Lösung lieferte beim Verdunsten Krystalle, die das Verhalten des Leucins zeigten.

Auf Grund dieser Versuche kann man behaupten, daß das beschriebene Produkt ein Protein einschloß. Es erinnert in seinem Verhalten an die in heißem verdünntem Alkohol löslichen Proteine, die man aus Weizenkleber dargestellt hat. Wir konnten aber ein solches Produkt auf dem gleichen Wege aus reifen Weizenkörnern, die von dem gleichen Felde stammten, nicht erhalten. Bei Ausführung des bezüglichen Versuches übergossen wir ein Kilo solcher Weizenkörner, ohne sie vorher zu zerkleinern, mit 95⁰/₁₀₀igem Alkohol, trennten nach Verlauf von einigen Monaten die schwach gelb gefärbte alkoholische Flüssigkeit von den Körnern und dunsteten sie sodann in gelinder Wärme ein. Der Verdampfungsrückstand ließ sich durch Behandeln mit Äther und Wasser in Lösung bringen. Allerdings war die von der ätherischen Schicht getrennte wässrige Lösung nicht ganz klar; doch schien die Trübung nur von einer kleinen, nicht in den Äther übergegangenen Fettmenge herzurühren. Jedenfalls blieb in diesem Falle nicht, wie in dem Versuche mit milchreifen Körnern, ein in Wasser und in Äther unlöslicher Rückstand. Bei den reifen Körnern lagen allerdings wohl die Verhältnisse für die Auflösung von Körnerbestandteilen durch den Alkohol weniger günstig als bei den milchreifen Körnern. Denn in die letzteren konnte der Alkohol wahrscheinlich besser eindringen; auch erfuhr er durch Aufnahme des in den unreifen Körnern enthaltenen Wassers eine nicht unbedeutliche Verdünnung.

Zum Schlusse teilen wir noch die Zahlen mit, die wir bei Bestimmung der auf Protein und auf Nichtprotein fallenden Stickstoffmenge erhielten.¹⁾

¹⁾ Die für die Analyse bestimmten milchreifen Körner wurden, nach-

	Stickstoff	
	im Protein	im Nichtprotein
Milchreife Weizenkörner	1,83 %	0,11 %
Reife Weizenkörner	2,24 %	0,16 %

Für die Verteilung des Gesamtstickstoffs auf Protein und Nichtprotein berechnen sich daraus folgende Zahlen:

	Von 100 Teilen des Gesamtstickstoffs fallen	
	auf Protein	auf Nichtprotein
Milchreife Weizenkörner	94,3 %	5,7 %
Reife Weizenkörner	93,3 %	6,7 %

III. Autolysenversuche mit unreifen Samen von *Pisum sativum* und *Phaseolus vulgaris*.

Wie schon in der Einleitung gesagt wurde, kann man es als bewiesen betrachten, daß zur Proteinsynthese in reifenden Samen nichtproteinartige Stickstoffverbindungen, die den Samen aus anderen Pflanzenteilen zufließen, verwendet werden. Wie aber diese Synthese verläuft, wissen wir nicht; es lassen sich darüber zurzeit nur Vermutungen aussprechen. Möglich ist es, daß die als Baustoffe der Proteinmoleküle den Samen zugeführten oder in ihnen synthetisch gebildeten Stickstoffverbindungen sich unter Austritt von Wasser zu Protein zusammenfügen, ein Vorgang, der vielleicht durch ein Enzym bewirkt wird.¹⁾ Im Gegensatz zu dieser Hypothese hat man aber auch die Vermutung ausgesprochen, daß in den Samen die ihnen als Material für die Proteinsynthese von außen zugeführten Stickstoffverbindungen zunächst einem Abbau unter Bildung von Ammoniak verfallen und daß aus letzterem unter Mitwirkung stickstofffreier organischer Stoffe Protein entsteht.

dem sie zuvor unter absolutem Alkohol aufbewahrt worden waren, bei 35—40° getrocknet, dann fein zerrieben. Den für die Analyse abgewogenen Quantitäten des Pulvers wurde selbstverständlich der entsprechende Teil des Extrakts, der beim Aufbewahren der Körner unter Alkohol sich gebildet hatte, hinzugefügt.

¹⁾ Diese Hypothese ist in der oben zitierten Abhandlung über den Abbau und den Aufbau organischer Stickstoffverbindungen in den Pflanzen von E. Schulze auf S. 656 u. ff. besprochen worden; wir verweisen auf das dort Gesagte.

Von vornherein kann es für wahrscheinlich erklärt werden, daß ein zur Ammoniakbildung führender Abbau jener Stickstoffverbindungen in den reifenden Samen durch Enzyme bewirkt werden würde. Das Vorhandensein solcher Enzyme müßte sich aber auch bei der Autolyse der unreifen Samen bemerklich machen. Dieser Gedanke veranlaßte uns zur Ausführung der im folgenden beschriebenen Versuche mit unreifen Samen von *Pisum sativum* und *Phaseolus vulgaris*. Über die Anordnung dieser Versuche sind hier zunächst einige Angaben zu machen.

Unter den aus den Hülsen den reifenden Samen zufließenden Stickstoffverbindungen überwiegt seiner Menge nach das Asparagin. Findet in den reifenden Samen ein Abbau von Stickstoffverbindungen in der angegebenen Weise statt, so ist anzunehmen, daß derselbe auch das Asparagin betrifft. Dies muß bei Autolyse der Samen zutage treten. Da aber der Asparagingehalt der unreifen *Pisum*- und *Phaseolus* samen sehr gering war, so haben wir in jedem Versuche ein abgewogenes Quantum von Asparagin zugesetzt. Um zu erfahren, inwieweit dieses Amid zersetzt worden war, ließen sich zwei verschiedene Wege einschlagen. Entweder konnten wir feststellen, wieviel Asparagin nach Beendigung des Versuchs sich wiedergewinnen ließ, oder wir konnten die während des Versuchs entstandene Ammoniakmenge bestimmen. Wir haben den ersten Weg gewählt, da derselbe uns größere Sicherheit zu gewähren schien.¹⁾ Zur Wiedergewinnung des nach Beendigung der Autolyse noch vorhandenen Asparagins wurde der Inhalt des Versuchskölbchens aufs Filter gebracht und mit Wasser gut ausgewaschen. Aus dem Filtrat entfernten wir zunächst die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stoffe. Dann wurde die Flüssigkeit mit Bleiessig versetzt und wieder aufs Filter gebracht. Dem Filtrat vom Bleiniederschlag fügten wir Mercurinitrat in schwachem Überschuß zu. Den durch dieses Reagens hervorgebrachten Niederschlag zersetzten wir, nachdem er abfiltriert und mit Wasser ausgewaschen worden

¹⁾ Dies ist schon dadurch bedingt, daß Ammoniakbildung während der Autolyse, außer auf Kosten von Asparagin, auch auf Kosten anderer in den Samen enthaltener Stickstoffverbindungen erfolgen konnte.

war, durch Schwefelwasserstoff. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber wurde mit Ammoniak neutralisiert und sodann in gelinder Wärme zum Sirup eingedunstet. Die nach dem Erkalten aus diesem Sirup sich ausscheidenden Asparaginkrystalle wurden nach Verlauf von einigen Tagen von der Mutterlauge getrennt, getrocknet und gewogen. Da aber, wie kaum gesagt zu werden braucht, die Abscheidung des Asparagins auf diesem Wege mit beträchtlichem Substanzverlust verbunden ist, so mußten wir mit jeder der von uns verwendeten Samenarten zwei Versuche (a und b) anstellen. Im Versuch a wurde das Kölbchen, nachdem es mit den fein zerriebenen Samen, dem Asparagin und der erforderlichen Wassermenge beschickt worden war, ca. 1 Stunde lang in kochendem Wasser erhitzt, um die in den Samen vorhandenen Enzyme unwirksam zu machen, im Versuch b geschah dies nicht. Beide Kölbchen wurden sodann ca. 4 Wochen lang auf eine Temperatur von ca. 35—38° erwärmt. Hierauf wurde ihr Inhalt in der oben angegebenen Weise behandelt. Aus einer Vergleichung der aus dem Inhalt der beiden Kölbchen wiedergewonnenen Asparaginquantitäten ließ sich erkennen, ob durch die in den Samen enthaltenen Enzyme Asparagin umgewandelt worden war.

Die für diese Versuche verwendeten Kölbchen waren zuvor durch Erhitzen auf ca. 150° sterilisiert worden; während des Versuchs wurden sie mit Baumwollpfropfen verschlossen. Als Antiseptikum wurde dem Inhalte eines jeden Kölbchens Chloroform und 0,5 g Fluorkalium zugefügt; ferner wurde die im Kölbchen befindliche Flüssigkeit mit Toluol überschichtet.

Die für unsere Versuche verwendeten Samen waren in dem weiter oben mit II bezeichneten Entwicklungsstadium geerntet worden — also in einem Zeitpunkte, in welchem ein starkes Wachstum der Samen und eine rasche Zunahme ihres Proteingehalts erfolgten. Die Samen von *Pisum sativum* waren unmittelbar nach der Ernte in absoluten Alkohol geworfen und, nach mehrtägigem Verweilen unter letzterem bei 35—40° getrocknet, hierauf fein zerrieben worden. Die Samen von *Phaseolus vulgaris* wurden in ganz frischem Zustande verwendet; vor dem Zerreiben wurden sie mit 1 ‰ iger Sublimat-

lösung gewaschen. Im folgenden teilen wir die in diesen Versuchen erhaltenen Resultate mit.

Versuche mit Samen von *Pisum sativum*.

In jedes der beiden Kölbchen wurden 10 g der lufttrocknen, fein zerriebenen Samen, 2 g Asparagin, die erforderliche Wassermenge und die oben angegebenen Antiseptika gebracht. Dauer der Autolyse: 4 Wochen. Wiedergewonnen wurden

im Versuch a	1,15 g Asparagin,
" " b	1,07 " "

Versuche mit Samen von *Phaseolus vulgaris*.

In jedes der beiden Kölbchen wurden 37 g der frischen, fein zerriebenen Samenkörner, 2 g Asparagin, die erforderliche Wassermenge und die oben angegebenen Antiseptika gebracht. Dauer der Autolyse: 4 Wochen. Wiedergewonnen wurden

im Versuch a	1,03 g Asparagin,
" " b	1,06 " "

Wie man sieht, haben wir in allen 4 Versuchen etwas mehr als 1 g Asparagin wiedergewonnen. Ein Unterschied zwischen den Versuchen a und b zeigte sich also nicht. Daraus ist zu schließen, daß ein Abbau des Asparagins während der Autolyse nicht erfolgt war. Wir konnten also nicht nachweisen, daß in den reifenden *Pisum*- und *Phaseolus* Samen ein Enzym sich vorfand, durch welches Asparagin unter Bildung von Ammoniak zersetzt wurde.

Daß in allen Versuchen nur ein Teil des zugesetzten Asparagins wiedergewonnen werden konnte, ist leicht zu erklären. Dieses Amid wird durch Mercurinitrat aus einer Lösung nicht quantitativ gefällt; auch krystallisiert dasselbe aus der bei Zerlegung des Niederschlags mittels Schwefelwasserstoff erhaltenen Lösung nicht vollständig aus. Ferner muß es als möglich bezeichnet werden, daß während des 4 Wochen lang dauernden Erwärms der schwach sauer reagierenden Flüssigkeit auf 35—40° ein kleiner Teil des Asparagins hydrolysiert worden war. Endlich kann es nicht für völlig sicher erklärt werden, daß durch die angewendeten Antiseptika das Vorhanden-

sein lebensfähiger Mikroben in den Versuchsflüssigkeiten ganz vollständig verhindert worden ist.

Daß die aus unseren Versuchsflüssigkeiten wiedergewonnenen Krystalle wirklich Asparagin waren, wiesen wir, außer durch die Anstellung von Reaktionen, durch die Ausführung von Krystallwasserbestimmungen nach. Diese Bestimmungen lieferten folgende Resultate:

1. 0,1200 g Substanz verloren beim Trocknen 0,0148 g = 12,33%
an Gewicht.
2. 0,1500 g Substanz verloren beim Trocknen 0,0187 g = 12,46%
an Gewicht.

Nach der Theorie enthält das Asparagin 12,0% Krystallwasser.

Zusammenfassung der Resultate.

Wenn man reife Leguminosensamen in verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung untersucht, so zeigt sich, daß während des Reifens der Prozentgehalt an Protein sehr stark steigt, während der prozentige Gehalt der Samen an «Nichtproteinstickstoff» abnimmt. Um entscheiden zu können, ob die absolute Menge des «Nichtproteinstickstoffs» während des Reifens sich verringert hat, genügt es aber nicht, die prozentige Zusammensetzung der reifen und unreifen Samen zu ermitteln;¹⁾ man muß auch feststellen, wieviel Stickstoff in der gleichen Anzahl von Samen auf Protein und auf Nichtprotein fällt. Bei den Samen von *Phaseolus vulgaris* konnte man auf letzterem Wege eine Abnahme des «Nichtproteinstickstoffs» während des Reifens nicht nachweisen. Anders ist es bei den Samen von *Pisum sativum*; hier zeigte sich, daß 100 Stück Samen nach dem Ausreifen weniger Nichtproteinstickstoff enthielten, als in unreifem Zustande. Doch war die Differenz nicht so groß, als man nach der großen Verschiedenheit des prozentigen Nichtproteinstickstoffgehalts der reifen und der unreifen Samen hätte erwarten können. Alle Beobachtungen sprechen dafür, daß in den reifenden Samen die den letzteren als Material für die Proteinsynthese aus anderen Pflanzenteilen zufließenden nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen in der Regel sehr rasch für jene Synthese verwendet werden.

¹⁾ Den Beweis dafür liefern die im Abschnitt I A mitgeteilten Zahlen.

Die Tatsache, daß bei den Leguminosen aus den Samenhülsen stickstoffhaltige Stoffe als Material für die Proteinsynthese in die reifenden Samenkörner übergehen, macht es wünschenswert, die Qualität der in den Samenhülsen sich vorfindenden nichtproteinartigen Stickstoffverbindungen festzustellen. Wir fanden, daß die Samenhülsen von *Pisum sativum* neben einer ansehnlichen Quantität von Asparagin in kleiner Menge Arginin, Histidin, Tryptophan, Monoaminofettsäuren, sowie Cholin und Trigonellin enthielten. Die gleichen Stoffe fanden sich auch in den Samenhülsen von *Phaseolus vulgaris*. Das in solchen Hülsen enthaltene Gemenge nichtproteinartiger Stickstoffverbindungen besitzt in bezug auf seine Zusammensetzung sehr große Ähnlichkeit mit demjenigen, das in den Keimpflanzen der Leguminosen aus den Cotyledonen und den Stengeln der Wurzelspitze und den Blättchen zufließt und in diesen Teilen ohne Zweifel als Material für die Proteinsynthese verwendet wird.

Das in den unreifen Samen von *Pisum sativum* enthaltene Gemenge nichtproteinartiger Stickstoffverbindungen wich in bezug auf die quantitative Zusammensetzung sehr stark von demjenigen ab, welches in den zugehörigen Samenhülsen sich vorfand. In letzterem überwiegt der Menge nach das Asparagin, während dieses Amid in den unreifen Samen nur in sehr kleiner Quantität gefunden wurde. Dagegen enthalten diese Samen Glutamin, welches in den Hülsen vielleicht in sehr kleiner Menge enthalten sein kann, aber doch darin bis jetzt nicht nachgewiesen worden ist. Arginin tritt in den unreifen Samen in weit größerer Menge auf, als in den Hülsen. Tryptophan war in den Hülsen nachzuweisen, in den unreifen Samen dagegen nicht. Der sehr geringe Gehalt der Samen an Asparagin läßt sich durch die Annahme erklären, daß dieser aus den Hülsen in bedeutender Menge den Samen zufließende Stoff in den letzteren rasch zur Proteinsynthese verwendet wurde. Wenn dagegen das Glutamin für diese Synthese nur sehr langsam oder gar nicht verbraucht wurde, so erklärt es sich, daß dieses Amid, auch wenn es aus den Hülsen nur in sehr kleiner Menge in die Samen übergang, in den letzteren doch in einer für seinen

Nachweis genügenden Quantität sich anhäufte. Ob man in der gleichen Weise auch die Anhäufung von Arginin in den unreifen Samen erklären kann, ist fraglich; es scheint fast, daß man eine synthetische Bildung dieser Base in den unreifen Samen annehmen muß.¹⁾ Mag man nun aber die im vorigen besprochenen Erscheinungen in dieser oder in einer anderen Weise erklären wollen, so sind dieselben doch jedenfalls bei der weiteren Erforschung der Proteinsynthese in reifenden Samen zu berücksichtigen.

Milchreife Samenkörner von *Triticum vulgare* enthielten nichtproteinartige Stickstoffverbindungen nur in höchst geringer Menge. Asparagin konnte aus diesen Samenkörnern nicht dargestellt werden. Arginin schien in sehr kleiner Quantität vorhanden zu sein, konnte aber nicht rein dargestellt und daher auch nicht sicher nachgewiesen werden. Monoaminofettsäuren fanden sich in sehr kleiner Menge vor.

Es gelang uns nicht, in den unreifen Samen von *Pisum sativum* und *Phaseolus vulgaris* durch Autolysenversuche das Vorhandensein eines Enzyms nachzuweisen, durch welches Asparagin unter Ammoniakbildung zersetzt wurde.

¹⁾ Wir verweisen auf die am Schluß des Abschnitts II dieser Abhandlung sich findende Diskussion der in jenem Abschnitt mitgeteilten Versuchsergebnisse.