

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE CHLOROPHYLLASE.

Von

HERBERT MAYER.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. März 1930.)

Einleitung.

WILLSTÄTTER hat bekanntlich nachgewiesen, daß in grünen Blättern ein Enzym vorkommt, das aus Chlorophyll Phytol abzuspalten vermag und von ihm Chlorophyllase benannt worden ist. Ein gewisser Sonderfall gegenüber anderen Fermenten ist darin gegeben, daß die Chlorophyllase noch in hochprozentigem Alkohol wirksam ist. Unter diesen Umständen wird die Phytolgruppe des Chlorophylls durch die Äthyl- bzw. Methylgruppe des betreffenden, als Lösungsmittel dienenden Alkohols substituiert (Alkoholyse). Auch in wasserhaltigem Aceton ist das Enzym wirksam, wobei die zugehörige Carboxylgruppe frei wird (Hydrolyse). Beide Vorgänge sind reversibel, so daß mit Hilfe der Chlorophyllase unter bestimmten Bedingungen der Phytolrest wieder in das Chlorophyllmolekül eingeführt werden kann.

Wenn auch WILLSTÄTTER die wesentlichen Eigenschaften der Chlorophyllase und deren Verbreitung schon beschrieben hat, so stehen doch noch manche Fragen offen, die auf Grund des heutigen Standes der Enzymtechnik zugänglich sind und auffallenderweise seit 19 Jahren von keiner Seite angegangen wurden.

Der Zweck der vorliegenden Arbeit war, einige dieser Punkte näher zu erfassen, wobei es sich vor allem um die noch unbekannte p_H -Abhängigkeit der Chlorophyllasewirkung, um das Verhalten der Chlorophyllkomponenten zum Enzym sowie um einige biologische Fragen handelt.

Erster Abschnitt.

Untersuchungen über die Wirkungsweise von Chlorophyllasepräparaten.

Allgemeine Methodik.

Da eine Abtrennung des Enzyms vom Blattgewebe mit großen Verlusten verknüpft ist, wurde als Enzymmaterial zunächst das Mehl getrockneter Blätter verwandt. Als Ausgangsmaterial dienten die Blätter von *Heracleum Sphondylium*, die nach WILLSTÄTTER¹ einen besonders hohen Gehalt an Chlorophyllase aufweisen. Diese wurden ohne die Blatt-

¹ WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. 378, 63 (1910).

stiele bei Zimmertemperatur und guter Durchlüftung vorgetrocknet und hierauf im Vakuumexsikkator zum völligen Austrocknen gebracht. Da nach WILLSTÄTTER¹ eine Schwächung der Enzymkraft unter Umständen schon beim Trocknen sowie beim längeren Aufbewahren eintreten kann, wurde das Trocknen möglichst rasch ausgeführt und das Material an einem kühlen und vor Feuchtigkeit geschützten Ort im allgemeinen nicht länger als einen Monat aufbewahrt. Älteres Material kam nur im Winter zur Verwendung, wenn keine frischen Pflanzen zur Verfügung standen. Da übrigens das Enzym in unzerkleinertem Material haltbarer zu sein scheint als im Blattmehl, wurde das Zermahlen der Blätter erst kurz vor den Versuchen vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden die exsikkator-trocknen Blätter in einer Porzellanmühle möglichst fein zerrieben und das Mehl mit einem Haarsieb von gröbereren Teilen (Blattrippen) abgeseibt.

Da aus später ersichtlichen Gründen zumeist mit einer bekannten Menge von reinem Chlorophyll gearbeitet werden mußte, wurde das Blattpulver vom Chlorophyll befreit. Dies geschah nach einem Verfahren WILLSTÄTTERS² durch Extraktion mit 80%igem Aceton, wobei gleichzeitig viele Begleitstoffe entfernt wurden. Um auch die letzten Reste des Chlorophylls zu beseitigen, wurde das feuchte Mehl in der Porzellanmühle unter allmählichem Zusatz der fünffachen Menge 90%igen Acetons 5 Minuten lang gerieben, auf der Nutsche abgesaugt und mit 90%igem Aceton nachgewaschen. Ließ sich in einer Probe des Mehls noch Chlorophyll nachweisen, so wurde das Reiben und Auswaschen mit 90%igem Aceton wiederholt, bis das Chlorophyll quantitativ entfernt war. Das Präparat wurde im Vakuumexsikkator getrocknet und daselbst aufbewahrt, kam jedoch nie später als nach 2 Tagen zur Verwendung, da seine enzymatische Wirksamkeit beim Aufbewahren nach WILLSTÄTTER³ nachläßt, und zwar erheblich rascher, als dies beim grünen, nicht extrahierten Blattpulver der Fall ist.

Zu dem chlorophyllfreien Enzym wurde bei allen Untersuchungen als Substrat das gleiche Chlorophyllpräparat zugesetzt. Dieses war infolge jahreszeitlicher Beschränkung aus einem Gemisch getrockneter Blätter von *Ficus*, *Dombeya* und *Musa* nach dem WILLSTÄTTERSchen Verfahren⁴ rein dargestellt worden. Die Versuchsanordnung entsprach den von WILLSTÄTTER⁵ für die enzymatische *Hydrolyse* des Chlorophylls an-

¹ WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. **378**, 53 (1910); **387**, 334 (1912).

² WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Untersuchungen über Chlorophyll, S. 133. Berlin 1913.

³ WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. **378**, 53 (1910).

⁴ WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Untersuchungen über Chlorophyll, S. 133. Berlin 1913.

⁵ In OPPENHEIMER, C. u. PINCUSSEN, L.: Die Methodik der Fermente, S. 740. Leipzig 1929. — WILLSTÄTTER, R.: Untersuchungen über Enzyme. I., S. 336. Berlin 1929.

gegebenen Bedingungen und wurde nur in einigen Punkten, jedoch in nicht grundsätzlicher Weise abgeändert:

0,5 g des chlorophyllfreien Enzympräparats wurden in einem Reagenzglas mit 2 ccm destilliertem Wasser befeuchtet, 10 Minuten der Quellung überlassen und hierauf mit einer Lösung von 4 mg reinem Chlorophyll a + b in 4 ccm wasserfreiem Aceton versetzt. Die Acetonkonzentration betrug demnach etwa 66%. Die Mischung wurde im Thermostaten, der mit einer Schüttelvorrichtung versehen war, gewöhnlich 1 Stunde lang geschüttelt. Obwohl WILLSTÄTTER¹ bei der enzymatischen Alkohololyse des Chlorophylls für die erste Hälfte der Umwandlung das Temperaturoptimum zu ungefähr 20° ermittelt hat, wurde als Versuchstemperatur 25° gewählt, da diese auch während der warmen Jahreszeit leicht einzuhalten war. Hierauf wurde die Enzymwirkung dadurch unterbrochen, daß die Versuchsflüssigkeit auf einer kleinen Nutsche abgesaugt und der Rückstand sogleich mit 25 ccm wasserfreiem Aceton in kleinen Anteilen extrahiert wurde. Aus dem Extrakt wurden die Farbstoffe im Schütteltrichter durch Entmischen mit destilliertem Wasser, eventuell unter Zusatz von Kochsalzlösung, in 30 ccm Äther überführt und mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Diese Lösung diente zur quantitativen Bestimmung der enzymatischen Umwandlung des Chlorophylls.

Hierfür wurde meistens das Verfahren verwandt, das auf der Löslichkeit der frei gewordenen Chlorophyllcarbonsäuren in wässriger alkalischer Lösung beruht²:

Die durch Einwirkung der Chlorophyllase gebildeten, freien Chlorophyllide wurden aus der ätherischen Lösung auf Grund ihres sauren Charakters mit 0,02 n-Kalilauge extrahiert; die so erhaltene Chlorophyllinsalzlösung wurde im Colorimeter nach DUBOSQ mit dem in der Ätherschicht verbliebenen unveränderten Chlorophyll verglichen, nachdem dieses mit 30%iger methylalkoholischer Kalilauge ebenfalls zu wasserlöslichem Chlorophyllinsalz verseift worden war.

In einigen Fällen ist die Bestimmung des Umsatzes auf Grund der Basizitätsprobe vorgenommen worden, die WILLSTÄTTER für die Alkohololyse ausgearbeitet hat, die jedoch auch bei der Hydrolyse anwendbar ist. Die anderen Methoden, wie Trennung der Farbstoffe auf Grund ihrer verschiedenen Löslichkeit oder Bestimmung des abgespaltenen Phytols, kamen hier nicht in Betracht, da es sich um eine Vielzahl von Versuchen mit geringen Farbstoffmengen handelte.

¹ WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. 378, 47 (1910).

² WILLSTÄTTER, R.: Untersuchungen über Enzyme. I., S. 336. Berlin 1929. — Ebenso in OPPENHEIMER, C. u. PINCUSSEN, L.: Die Methodik der Fermente, S. 740. Leipzig 1929.

A. Untersuchungen über die p_H -Abhängigkeit der Chlorophyllasewirkung.**Voruntersuchung.**

Die zahlreichen Untersuchungen über die Abhängigkeit der Enzymwirkung von den p_H -Bedingungen sind noch nie auf die Chlorophyllase ausgedehnt worden. WILLSTÄTTER und STOLL¹ geben nur an, daß Zusatz von Calciumcarbonat deren Wirkung nicht beeinträchtigt, während Magnesiumoxyd eine starke Verzögerung zur Folge hat. Die Schwierigkeit bei derartigen Untersuchungen führen die beiden Forscher darauf zurück, daß das als Enzympräparat dienende Blattpulver eine außerordentlich hohe Adsorptionsfähigkeit gegenüber Säuren und Alkalien aufweist. Dabei ist zu berücksichtigen, daß das Blattgewebe unter Umständen eine andere Acidität besitzt als die betreffende Lösung, in der es sich befindet, und wohl auch stark gepuffert ist (vgl. hierzu S. 313).

Unter Zugrundelegung der auf S. 296 angegebenen Bestimmungsmethode der Chlorophyllasewirkung wurden mit dem enzymhaltigen Blattpulver mehrere Reihen von p_H -Versuchen im Bereich von $p_H = 2,5$ bis $p_H = 8,8$ angesetzt. Als Puffer dienten Phosphat- und Citratmischungen nach RONA². Die p_H -Werte wurden im späterhin verlassenen Komparator nach MICHAELIS, jedoch ohne Zusatz des Chlorophylls bestimmt, da dieses die Farbindikatoren verdeckt hätte. Außer der enzymatischen Hydrolyse in 66%igem Aceton wurde bei den Versuchen auch die Alkoholyse des Chlorophylls in 80%igem Äthylalkohol³ benutzt, wobei die Versuchsanordnung in entsprechender Weise abgeändert wurde und zum Nachweis der Enzymwirkung die Basizitätsprobe Verwendung fand. Außerdem wurde unter Verwendung von Wasser als Dispersionsmittel der Gang der Hydrolyse in kolloidaler Chlorophylllösung untersucht, die folgendermaßen hergestellt war: Chlorophyll a + b wurde in möglichst wenig Methylalkohol unter Zusatz einiger Tropfen Äther gelöst, unter Umschwenken allmählich destilliertes Wasser zugegeben und mittels einer Kapillare so lange Luft durch die Flüssigkeit geleitet, bis das organische Lösungsmittel entfernt war.

Der quantitative Nachweis der Enzymwirkung ergab innerhalb derselben Versuchsreihe trotz der stark variierten p_H -Verhältnisse stets eine ziemlich gleichbleibende Wirksamkeit der Chlorophyllase. Auf einen Einfluß der p_H -Bedingungen konnte also bei Verwendung von Blattpulver als Enzymmaterial nicht geschlossen werden.

a) Versuche zur Isolierung der Chlorophyllase aus dem Blattgewebe.

Um die oben beschriebenen Störungen durch das Blattgewebe zu vermeiden, wurde nun versucht, in Anlehnung an WILLSTÄTTER die Chloro-

¹ WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. **378**, 50 (1910).

² RONA, P.: Praktikum der physiologischen Chemie. I., S. 56. Berlin 1926.

³ Vgl. WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. **378**, 46 (1910).

phyllase zu isolieren: Das enzymhaltige Blattpulver wurde zunächst mit Wasser, mit wässrigen Pufferlösungen sowie mit Glycerin behandelt, doch zeigten die Extrakte so gut wie keine enzymatische Wirksamkeit. Dieses Ergebnis wird durch eine neuere Mitteilung WILLSTÄTTERS¹ bestätigt, wonach der trocknen Blattsubstanz die Chlorophyllase weder durch Wasser noch durch Glycerin entzogen wird.

Dagegen gelang es WILLSTÄTTER², aus frischen Blättern einen Teil der Chlorophyllase dadurch zu isolieren, daß er den Blattbrei unter 250 Atmosphären Druck abpreßte. Aus dem Preßsaft fällte er das Enzym mit dem doppelten Volum Alkohol und erhielt so konzentrierte Enzympräparate. Verfasser konnte bei Anwendung dieser Methode niemals eine Steigerung der enzymatischen Wirksamkeit gegenüber dem gewöhnlichen Blattpulver beobachten; vielmehr wiesen die Präparate einen sehr geringen Chlorophyllasegehalt auf, weshalb sie zur Ausführung größerer Reihen von p_H -Versuchen nicht geeignet waren.

Das Ergebnis wurde auch nicht besser, als die Blätter unter Zusatz von Calciumcarbonat oder von verschiedenen stark gepufferten Lösungen zerrieben wurden und der erhaltene Blattbrei nach mehrtägiger Autolyse unter 350 Atmosphären Druck abgepreßt wurde; das Enzym wurde mit Alkohol, Aceton oder Ammonsulfat gefällt, oder aber wurde der Preßsaft im Hochvakuum bei 40° bis nahe zur Trockne eingeengt. Außerdem kamen auch einige Adsorptionsmethoden zur Anwendung, über die bei der Chlorophyllase bisher noch keinerlei Erfahrungen vorliegen: Chlorophyllasehaltiger Preßsaft sowie eine Aufschwemmung destruiertes Chloroplastenmasse, wie sie später beschrieben wird, wurde mit verschiedenen Adsorbentien, wie z. B. Talk, Kaolin oder frisch vorbereitetem Aluminiumhydroxyd C³ geschüttelt, jedoch wurde in keinem Fall eine Steigerung des enzymatischen Wirkungsgrades erzielt.

b) Darstellung eines geeigneten Enzympräparates.

NOACK⁴ ist es gelungen, die Chloroplasten, wenn auch in destruiertem Zustand, von den übrigen Blattbestandteilen abzutrennen. Da von vornherein in dieser Chloroplastenmasse Enzymgehalt vermutet werden konnte, wurde versucht, ein derartiges Material zu p_H -Versuchen zu verwenden, ohne die früher beschriebenen Störungen, die durch Adsorptionswirkung des Blattgewebes bedingt sind, befürchten zu müssen.

Die Methode ist folgende: Die frischen Blätter werden mit Wasser unter Zusatz von Calciumcarbonat zerrieben. Nach dem Abzentrifugie-

¹ WILLSTÄTTER, R.: Untersuchungen über Enzyme. I., S. 335. Berlin 1929. — Ebenso in OPPENHEIMER, C. u. PINCUSSEN, L.: Die Methodik der Fermente, S. 740. Leipzig 1929.

² WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. 378, 52 (1910).

³ Vgl. WILLSTÄTTER, R. u. KRAUT, H.: Ber. dtsh. chem. Ges. 56, 1118 (1923)

⁴ NOACK, KURT: Biochem. Z. 188, 142 (1927).

ren der groben Teile und Filtration der Flüssigkeit durch ein Hartfilter erhält man eine Suspension kleinster Chloroplastenfragmente, die durch scharfes Zentrifugieren, Ultrafiltration, Aussalzen oder Fällern mit Aceton und Alkohol abgeschieden werden können. Sowohl nach Abzentrifugieren als auch nach Entfernung des Dispersionsmittels mit Hilfe des Ultrafilters zeigte die Chloroplastenmasse eine gute enzymatische Wirksamkeit, während in der abgetrennten Flüssigkeit nur ein äußerst geringer Chlorophyllasegehalt nachzuweisen war.

Für die Hauptversuche wurde mit Aceton ausgefällte Chloroplastenmasse verwandt. Der Niederschlag wurde durch Extraktion mit wasserfreiem Aceton vom Chlorophyll befreit, wobei rasch gearbeitet werden mußte, um eine Schädigung des Enzyms zu vermeiden.

Im folgenden wird ein Beispiel für die Darstellung eines Enzympräparates dieser Art geschildert: 500 g frische *Heracleum*-Blätter wurden mit Sand unter allmählichem Zusatz von 1,5 l Wasser in der Porzellanmühle fein zerrieben, das Reibgemisch zur Entfernung der Gewebebruchstücke und des Sandes in mehreren Fraktionen je 5 Minuten lang bei hoher Tourenzahl zentrifugiert und die Flüssigkeit vom Sediment abgossen. Hierauf wurden die vereinigten Fraktionen in einem Dekantiergefäß unter Umrühren allmählich mit dem doppelten Volum Aceton versetzt. Nach dem Absetzen des entstandenen Niederschlags wurde dekantiert, der Niederschlag in der Nutsche auf einem Hartfilter gesammelt und mit wasserfreiem Aceton so lange extrahiert, bis die ablaufende Flüssigkeit nicht mehr gefärbt war. Das Präparat wurde im Vakuumexsikkator getrocknet und kam sogleich zur Verwendung. Die Ausbeute betrug etwa 15 g.

c) Bestimmung der p_{H} -Abhängigkeit der Chlorophyllasewirkung.

Mit Hilfe eines derartigen Enzympräparates gelang es nun, in gepufferten Lösungen von verschiedener Acidität ähnliche Unterschiede in der Enzymwirkung festzustellen, wie sie für andere Fermente beschrieben worden sind. Die p_{H} -Werte wurden in der Versuchsflüssigkeit selbst mit Hilfe der Gaskettenmethode gemessen. In mehreren Reihen von Vorversuchen wurden zunächst stets analoge Verhältnisse der p_{H} -Abhängigkeit beobachtet, wobei p_{H} -Werte von etwa 6,0 das Wirkungsoptimum darstellten. Zur genauen Bestimmung der Chlorophyllasewirkung in einem weiteren p_{H} -Bereich wurde hierauf eine große Versuchsreihe mit stark variierten p_{H} -Verhältnissen angesetzt.

Die Versuchsanordnung war folgende: 0,5 g Enzympräparat wurden mit 2 ccm Pufferlösung und 4 ccm wasserfreiem Aceton versetzt, in dem zuvor 4 mg reines Chlorophyll gelöst worden waren, und die Mischung umgeschüttelt. Nach kurzem Absitzenlassen wurde 1 ccm der Lösung mit der Pipette abgehoben und der p_{H} -Wert ermittelt. Dabei ergab sich, daß infolge Eigenpufferung des Enzympräparates der ursprüngliche p_{H} -

Wert der Pufferlösung in vielen Fällen erheblich beeinflußt worden war. Infolgedessen mußte zur Einstellung der Versuchsmischung auf niedrige p_H -Werte statt Puffermischung eine entsprechend verdünnte Salzsäure zugesetzt werden. Für p_H -Werte unterhalb 4,0 wurde 0,3, 0,2 und 0,1 n-Salzsäure verwandt, für $p_H = 4,0$ bis 6,4 Citratpuffer nach KOLTHOFF¹, für $p_H = 6,6$ —8,9 0,5 n-Phosphatlösungen und für $p_H = 9,9$ —12,1 Boratpuffer, beide nach RONA². Eine Hemmung der Enzymwirkung durch Borat, wie sie von ERDTMAN³ und HOMMERBEY⁴ für Phosphatase festgestellt worden ist, kommt für die Chlorophyllase, wie aus den auf S. 302 verzeichneten Ergebnissen ersichtlich ist, nicht in Frage, da der Übergang des Phosphatpuffers zum Boratpuffer sich nicht in einem abnormen Verlauf der Kurven äußerte. Die Versuchsmischung wurde sogleich, d. h. vor Ausführung der p_H -Messung in den Thermostaten gebracht und selbst 8 Stunden lang bei 25° geschüttelt. Während bei anderen Untersuchungen eine einstündige Einwirkung der Chlorophyllase genügte, mußte die Versuchsdauer in vorliegendem Fall auf 8 Stunden ausgedehnt werden, da das verwandte Präparat ziemlich arm an Chlorophyllase war und unter den Grenzbedingungen der Pufferung, d. h. im stark sauren und stark alkalischen Gebiet, nur geringen Umsatz bewirkte.

Hierauf wurde die Mischung auf eine kleine Nutsche gebracht und die Gesamtheit der Farbstoffe mit insgesamt 20 ccm wasserfreiem Aceton quantitativ extrahiert, was hier sehr leicht auszuführen war, während bei Verwendung von Blattpulver als Enzymmaterial auch in dieser Hinsicht gewisse Schwierigkeiten bestehen. Nach Überführung der extrahierten Farbstoffe in Äther wurden diese in Form ihrer wasserlöslichen Chlorophyllinsalze colorimetrisch verglichen und aus den erhaltenen Werten die Umwandlungszahl u berechnet, die angibt, wieviel Prozente des ursprünglich vorhandenen Chlorophylls durch Enzymwirkung gespalten worden sind. Im gesamten p_H -Bereich wurden außerdem Kontrollversuche unter Verwendung eines Präparates ausgeführt, dessen Enzymwirkung zuvor durch 10 Minuten langes Erhitzen mit Wasser auf 100° völlig zerstört worden war; diese ergaben in keinem Falle Hydrolyse.

Beim colorimetrischen Vergleich wurde öfters eine Verschiedenheit der Farbtöne beobachtet. Diese Erscheinung wird als Fehler der Methode auch von WILLSTÄTTER⁵ erwähnt und auf größere Reaktionsgeschwindigkeit der gelbstichigen Chlorophyllkomponente b gegenüber der

¹ KOLTHOFF, J. M. u. VLEESCHOUWER, J. J.: Biochem. Z. 183, 444 (1927).

² RONA, P.: Praktikum der physiologischen Chemie. I., S. 57. Berlin 1926.

³ ERDTMAN, H.: Hoppe-Seylers Z. 172, 182 (1927).

⁴ HOMMERBEY, CL.: Ebenda 185, 123 (1929).

⁵ WILLSTÄTTER, R.: Untersuchungen über Enzyme. I, S. 336. Berlin 1929.
Ders. in OFFENHEIMER, C. u. PINCUSSEN, L.: Die Methodik der Fermente, S. 741. Leipzig 1929.

blautichigen Komponente a zurückgeführt. Auf Grund der weiter unten mitgeteilten Versuche mit den isolierten Chlorophyllkomponenten, von denen sich stets die Komponente a als die reaktionsfähigere erwies, konnte die WILLSTÄTTERSche Annahme nicht bestätigt werden. Der Fehler der Methode beruht wohl hauptsächlich auf der chemischen Verschiedenheit der zu vergleichenden Reaktionsprodukte des Chlorophylls, die einerseits durch Enzymwirkung, andererseits durch alkalische Verseifung gebildet werden. Während nämlich die Chlorophyllase lediglich auf die Phytol estergruppe des Chlorophylls einwirkt, wird bei der tiefer greifenden Verseifung durch Alkalien unter Bildung von Methylalkohol auch die zweite Estergruppe gespalten und gleichzeitig eine molekulare Umlagerung hervorgerufen, indem der von WILLSTÄTTER¹ angenommene Lactamring (nach H. FISCHER² soll Lactonbildung vorliegen) zunächst unter Farbumschlag nach Braun gesprengt wird und hierauf unter Wiederkehr der grünen Farbe eine neue Ringbildung eintritt. Hierzu kommt bei saurer Reaktion des Versuchsmilieus als weitere Fehlerquelle die teilweise Bildung von Phäophytin. Diese konnte durch spektroskopische Untersuchung der ätherischen Farbstofflösungen schon im schwach sauren Gebiet nachgewiesen werden und verursachte im stärker sauren Gebiet eine mit sinkendem p_H -Wert zunehmende Bräunung der Lösungen. Auf den Verlauf der enzymatischen Hydrolyse hat die Phäophytinbildung allerdings keinen Einfluß, da später gezeigt wird, daß die Umsetzungsgeschwindigkeit des Phäophytins mit der des Chlorophylls übereinstimmt (vgl. S. 307f.). Dagegen wird der colorimetrische Nachweis der Enzymwirkung dadurch erschwert, daß bei der alkalischen Verseifung aus Phäophytin a + b außer den normalen Spaltprodukten Phytochlorin e und Phytorhodin g sehr leicht auch andere Spaltprodukte entstehen³. Da sich jedoch im allgemeinen nur geringe Abweichungen der zu vergleichenden Farbtöne ergaben, war die erwähnte Bestimmungsmethode fast durchweg brauchbar.

Größere Farbdifferenzen wurden nur im stark sauren Gebiet beobachtet. In diesem Fall wurde der betreffende Versuch wiederholt, wobei als Grundlage für die Hydrolysebestimmung die Basizitätsprobe diente: Aus der ätherischen Farbstofflösung wurden die enzymatisch hydrolysierten Farbstoffe mit 22%iger Salzsäure in Form der freien Phäophorbide quantitativ extrahiert. Die enzymatisch nicht veränderten Farbstoffe, die in Form von Phäophytin a + b in der Ätherschicht zurückbleiben, wurden hierauf durch Verseifung mit rauchender Salzsäure eben-

¹ WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Untersuchungen über Chlorophyll, S. 335. Berlin 1913.

² FISCHER, H.: Ann. d. Chem. 475, 241 (1929.).

³ Vgl. WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Untersuchungen über Chlorophyll, S. 290. Berlin 1913.

falls in die freien Phäophorbide übergeführt. Zu diesem Zweck wurde die ätherische Lösung nach WILLSTÄTTER¹ mit 35%iger Salzsäure versetzt und 1 Stunde lang geschüttelt, so daß quantitative Umsetzung erfolgte. Die Phäophorbide, die sich zunächst in der sauren Schicht befanden, wurden durch Zusatz von Wasser wieder in Äther überführt und mit 22%iger Salzsäure extrahiert, wonach die beiden salzsauren Phäophorbidlösungen colorimetrisch verglichen wurden.

1. Versuche mit Chlorophyll a + b.

Die auf dieser Grundlage unternommenen Pufferversuche ergaben bei Verwendung von Chlorophyll a + b, bei dem das Verhältnis der beiden Komponenten a : b, d. h. $\frac{Q_a}{b} = 2,1$ war, folgende Werte für u:

Tabelle 1. 0,5 g chlorophyllfreies Enzympräparat, 4 mg Chlorophyll a + b, 6 ccm 66%iges Aceton. 8 Stunden, 25°.

p _H	u	p _H	u						
1,4	5	4,6	58	5,9	81	6,8	65	8,9	8
2,1	10	5,4	76	6,0	80	7,0	54	9,9	7
3,2	24	5,7	80	6,1	79	7,7	40	11,2	6
4,0	44	5,8	80	6,4	75	8,3	11	12,1	5

Das p_H-Optimum lag also bei p_H = 5,9, d. h. bei einem Punkt, der mit dem Wechsel der zugesetzten Puffersubstanzen nicht zusammenfiel.

In der Kurve (Abb. 1) sind die p_H-Werte auf der Abszisse, die Werte von u auf der Ordinate eingetragen. Die Kurve zeigt im sauren Gebiet

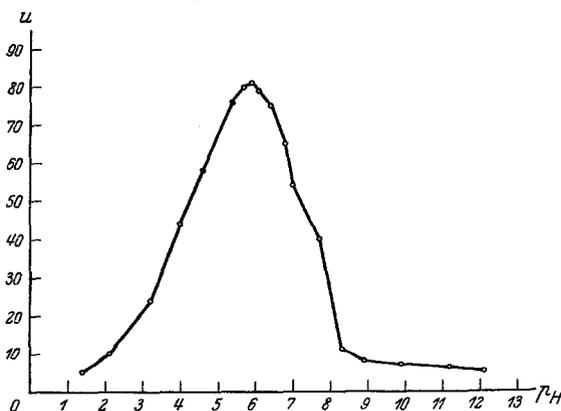


Abb. 1.

bis zu p_H = 5,7 ein stetes Ansteigen der Umwandlungszahl, von p_H = 6 bis p_H = 8,3 einen ziemlich steilen Abfall, der sich im stärker alkalischen Gebiet stark vermindert.

¹ WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. 387, 380 (1912).

Diese Abflachung könnte auf Allomerisation des Chlorophylls beruhen, wie sie beim langen Stehenlassen von Chlorophylllösungen besonders bei Gegenwart von Alkali leicht eintritt und die, wie später mitzuteilen ist, die Enzymwirkung hemmt. Doch konnte auf Grund der Phasenreaktion, die bei Behandlung des unzersetzt gebliebenen Chlorophylls mit 30%iger methylalkoholischer Kalilauge auftrat, in keinem Fall Allomerisation nachgewiesen werden, da die braune Phase stets in normaler Weise gebildet wurde. Die Verflachung der Kurve im alkalischen Gebiet könnte außerdem auf eine unmittelbar verseifende Wirkung durch das Alkali zurückgeführt werden; dem widerspricht jedoch das völlige Intaktbleiben des Chlorophylls in den Kontrollversuchen mit zerstörtem Enzym (vgl. S. 300).

2. Versuche mit den getrennten Chlorophyllkomponenten a und b.

In zwei weiteren Reihen wurden Pufferversuche mit den aus Reinchlorophyll isolierten Chlorophyllkomponenten a und b ausgeführt. Die Trennung wurde nach dem von WILLSTÄTTER¹ beschriebenen Verfahren ausgeführt, indem besondere Sorgfalt darauf verwandt wurde, daß während der Trennungsoperation keine Allomerisation des Chlorophylls eintrat. Bei beiden Versuchsreihen diente als Enzym ein und dasselbe Präparat, das kurz vor den Untersuchungen frisch dargestellt worden war. Die Versuchsbedingungen waren — abgesehen von der Verwendung eines anderen, und zwar weniger wirksamen Enzympräparats — genau dieselben, wie auf S. 299f. angegeben. Es ergaben sich folgende Werte von u:

Tabelle 2. 0,5 g chlorophyllfreies Enzympräparat, 4 mg Substrat, 6 ccm 66%iges Aceton. 8 Stunden, 25°.

Chlorophyll a				Chlorophyll b			
p _H	u						
0,5	0	7,2	55	1,6	1	6,6	45
3,0	8	7,4	52	1,7	1	7,4	24
3,8	25	8,4	43	3,8	7	8,4	14
4,1	31	8,5	42	4,8	22	9,1	12
4,5	39	9,0	39	5,4	36	10,0	11
5,4	57	10,2	33	5,6	41	11,2	11
5,7	63	11,1	26	6,2	50	12,0	10
6,2	67	12,0	23				
6,4	64						

Die für die getrennten Komponenten a und b ermittelten p_H-Kurven (Abb. 2) können wohl unter sich, jedoch nicht mit der Kurve (Abb. 1), die sich auf das Chlorophyllgemisch a + b bezog, verglichen werden. Die

¹ WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Untersuchungen über Chlorophyll, S. 162. Berlin 1913.

zugesezte Menge der isolierten Komponenten beträgt nämlich jeweils 4 mg, während bei jedem Versuch der ersten Reihe 4 mg Chlorophyllgemisch a + b vorlagen. Hierzu kommt noch die Verwendung eines schwächeren Enzympräparates (siehe S. 303).

Was das p_H -Optimum betrifft, so zeigen die beiden Kurven (Abb. 2) unter sich, wie auch mit der früheren Kurve des Chlorophylls a + b Übereinstimmung. Die geringe Verlagerung des Optimums der a- bzw. b-Kurve gegen das alkalische Gebiet wird wohl damit zusammenhängen, daß in der Optimalregion weniger Punkte als bei der Untersuchung des Chlorophyllgemisches festgelegt worden sind. Ein unterschiedliches Verhalten zwischen Chlorophyll a und b zeigt sich insofern, als die b-Kurve im p_H -Bereich oberhalb 6,2 zuerst steil abfällt, um sich dann stark abzuflachen, während die a-Kurve in diesem Bereich einen ziemlich gleich-

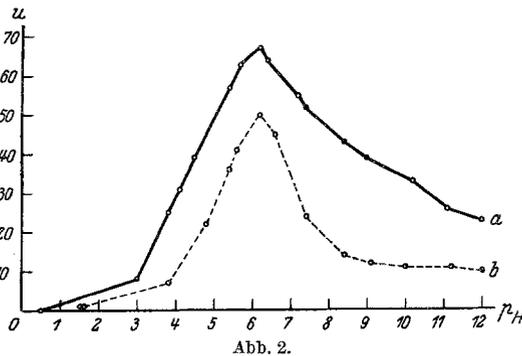


Abb. 2.

mäßigen Verlauf aufweist. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Kurven besteht ferner darin, daß das Chlorophyll a für sämtliche p_H -Werte eine größere Reaktionsfähigkeit zeigt als das Chlorophyll b. Über dieses Verhalten der Chlorophyllase zu den isolierten

Chlorophyllkomponenten wird im nächsten Abschnitt ausführlicher berichtet.

Als allgemeiner Befund ist die Tatsache hervorzuheben, daß die Chlorophyllase trotz ihrer auffallend großen Wirksamkeit in hohen Alkoholkonzentrationen hinsichtlich ihrer p_H -Abhängigkeit keinen besonderen Fermenttypus darstellt.

B. Vergleichende Untersuchungen über das Verhalten der durch Chlorophyllase spaltbaren Chlorophyllderivate und deren Komponenten.

In anderen Versuchen wurde eine Reihe von Chlorophyllderivaten und deren Komponenten hinsichtlich ihrer enzymatischen Angreifbarkeit verglichen, jedoch mit der Modifizierung, daß lediglich extrahiertes Blattpulver als Enzymmaterial diente. Die p_H -Abhängigkeit wurde in folgedessen nicht weiter berücksichtigt, wie auch die auf S. 297 mitgeteilten Befunde über verschiedene H-Ionenkonzentrationen im Blattpulver und umgebendem Lösungsmittel außer acht gelassen werden konnten.

Untersuchungen über die Einwirkung der Chlorophyllase auf die iso-

lierten Chlorophyllkomponenten a und b sind bereits von WILLSTÄTTER¹ angestellt worden; jedoch scheinen sich dabei eindeutige Unterschiede der Reaktionsfähigkeit zwischen a und b nicht ergeben zu haben, da er hierüber keine Angaben macht. Hingegen hebt er an anderer Stelle hervor, daß Chlorophyll b rascher hydrolysiert wird als a. Ferner hat WILLSTÄTTER² die Wirkung der Chlorophyllase auf das Phäophytinmisch a + b untersucht und dabei unter den Bedingungen der Alkoholyse nur langsame Umsetzung, in wasserhaltigen Mischungen von Alkohol mit Äther oder Aceton bei gleichzeitiger Alkoholyse und Hydrolyse etwas größere Umsatzgeschwindigkeit erhalten. Mit Methylchlorophyllid b erzielte er eine langsame enzymatische Hydrolyse. Über das Verhalten der Chlorophyllase zu allomerem Chlorophyll macht WILLSTÄTTER keine Angaben.

Die folgenden Untersuchungen stellen einen Vergleich zwischen dem Verhalten von Chlorophyll a + b, den beiden isolierten Komponenten und den allomeren Zuständen dar, wobei außerdem die entsprechenden Phäophytinderivate mit einbezogen wurden. Die enzymatische Einwirkung fand im allgemeinen nur unter den Bedingungen der Hydrolyse statt.

Die Versuchsbedingungen waren bei allen unter a) bis d) mitzuteilenden Untersuchungen dieselben, so daß sich ihre Ergebnisse ohne weiteres vergleichen lassen. Als Enzympräparat diente Blattpulver von *Heracleum*, das aus den Blättern gleicher Ernte hergestellt und vor Ausführung der Reihenversuche durch Extraktion mit verdünntem Aceton vom eigenen Chlorophyll völlig befreit worden war. *Sämtliche Versuche wurden mit demselben Enzympräparat innerhalb einer kurzen Zeitspanne ausgeführt.* Der besonders ermittelte p_H -Wert der Versuchsmischungen ($p_H = 5,9$) war gemäß der im Abschnitt A mitgeteilten Befunde als optimal anzusehen. Als Substrat diente Reinchlorophyll, die daraus isolierten Komponenten und Chlorophyllderivate, die aus diesen Farbstoffen dargestellt waren. Die Versuchsordnung war folgende: 0,5 g Enzympräparat wurden mit 2 ccm destilliertem Wasser und 4 ccm wasserfreiem Aceton, in dem 4 mg Substrat gelöst waren, 1 Stunde lang im Thermostaten bei 25° geschüttelt. Hierauf wurden die Farbstoffe in Äther überführt und der Grad der enzymatischen Umwandlung gemäß der im folgenden beschriebenen Methoden bestimmt. Sämtliche Untersuchungen wurden mehrmals wiederholt, wobei die Ergebnisse stets weitgehend übereinstimmten. Die so ermittelten Durchschnittswerte sind am Schluß des Abschnitts d) zu einer Tabelle zusammengestellt. Zu jedem Versuch wurde außerdem ein Kontrollversuch mit erhitztem Enzymmaterial ausgeführt.

¹ WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. **387**, 335 (1912).

² WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ebenda **378**, 69 (1910).

a) *Chlorophyll a + b und die isolierten Komponenten a und b.*

Als Bestimmungsmethode für die enzymatische Spaltung des Chlorophyllgemisches a + b diente zunächst das auf S. 296 beschriebene Verfahren, das auf dem colorimetrischen Vergleich der Chlorophyllinsalze beruht. Dabei ergab sich in mehreren Versuchen als Summenwert des erfolgten Umsatzes übereinstimmend $u = 70$.

Auf dieselbe Weise wurde die enzymatische Hydrolyse der Chlorophyllkomponenten a und b getrennt bestimmt, nachdem jeweils 4 mg Chlorophyll a bzw. Chlorophyll b mit 6 ccm Lösungsmittel 1 Stunde bei 25° geschüttelt worden waren. Der erfolgte Umsatz (u) betrug für das isolierte Chlorophyll a 78, für das Chlorophyll b 43. WILLSTÄTTER¹ bemerkt, daß die getrennten Komponenten mit getrockneten *Heracleum*-Blättern sehr träge reagieren (in 1 Stunde $u = 10$), und vermutet, daß „die isolierten Chlorophyllide mit dem enzymhaltigen Blatte nicht das vollkommene System für die Reaktion der Chlorophyllase bilden“. Aus obigen Versuchen, wie auch aus den auf S. 303 beschriebenen p_H -Versuchen ergibt sich jedoch eine beträchtlich höhere Umsatzgeschwindigkeit.

Die Hydrolyse des Chlorophyllgemisches a + b ($\frac{Q_a}{b} = 2,1$) wurde außerdem nach einer anderen Methode bestimmt, welche die Trennung der Spaltprodukte von a und b in Form der freien Phäophorbide auf Grund deren verschiedener Basizität erlaubt: Die Farbstoffe wurden aus der Versuchsmischung in Äther überführt, worauf mit 16%iger Salzsäure das freie Phäophorbid a quantitativ nach WILLSTÄTTER extrahiert wurde². Das freie Phäophorbid b, das in der Ätherschicht zurückblieb, wurde durch Ausschütteln mit 22%iger Salzsäure extrahiert. Hierauf wurde der in Äther zurückgebliebene, nicht hydrolysierte Anteil des Chlorophylls a + b zum colorimetrischen Vergleich in derselben Weise aufgearbeitet, nachdem er mit 35%iger Salzsäure, wie S. 301 beschrieben, zu Phäophorbid a + b verseift worden war. Die Berechnung des Umsatzes ergab für Chlorophyll a $u = 76$, für Chlorophyll b $u = 55$. Der früher genannte Umsatzwert ($u = 70$), der sich auf das Gemisch der umgesetzten Bestandteile a + b bezog, liegt also zwischen den für die einzelnen Komponenten ermittelten Werten. Außerdem ist zu betonen, daß Chlorophyll a eine größere Umsetzungsgeschwindigkeit als Chlorophyll b zeigte, während WILLSTÄTTER umgekehrte Verhältnisse fand.

b) *Phäophytin a + b und seine isolierten Komponenten a und b.*

Zur Darstellung des Phäophytins a + b wurde eine ätherische Lösung von Chlorophyll a + b mit 5%iger Salzsäure geschüttelt, bis quantitative Umsetzung in Phäophytin erfolgt war. Ebenso wurde bei der Darstellung

¹ WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. **387**, 335 (1912).

² Vgl. WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. **387**, 379 f. (1912).

der Phäophytinkomponenten a und b aus isoliertem Chlorophyll a und b verfahren. Nach Auswaschen bis zur Chlorfreiheit und Entwässern mit geglühtem Natriumsulfat wurden die ätherischen Lösungen im Helmkolben bei 40° zur Trockne verdampft.

WILLSTÄTTER¹ hat das Phäophytin unter den Bedingungen der reinen Hydrolyse nicht untersucht und bei der Alkoholyse des Phäophytins in Äther-Alkohol keine guten Resultate erhalten. Im folgenden werden daher vergleichende Enzymversuche mit Chlorophyll und Phäophytin beschrieben, die im Fall der Hydrolyse in 66%igem Aceton, im Fall der Alkoholyse in 80%igem Alkohol ausgeführt wurden.

Die enzymatische Hydrolyse wurde mit Hilfe der Basizitätsprobe bestimmt, wie auf S. 301 angegeben ist. Dabei ergab sich für Phäophytin a + b annähernd dieselbe Umsetzungsgeschwindigkeit wie bei der oben beschriebenen Hydrolyse des Chlorophylls a + b, nämlich $u = 69$.

Die Alkoholyse des Chlorophylls a + b wie auch des Phäophytins a + b wurde unter folgenden Bedingungen untersucht: Je 0,5 g eines etwas weniger wirksamen Enzympräparates wurden mit 4 mg Substrat und 6 ccm 80%igem Alkohol im Thermostaten von 25° 5 Stunden lang an der Maschine geschüttelt und hierauf der erfolgte Umsatz mittels der Basizitätsprobe festgestellt. Für Chlorophyll a + b ergab sich $u = 56$, für Phäophytin a + b ein ähnlicher Wert, nämlich $u = 53$. Sowohl bei der Hydrolyse als auch bei der Alkoholyse verläuft also die enzymatische Umwandlung des Phäophytins a + b annähernd mit derselben Geschwindigkeit wie die Umwandlung des Chlorophylls a + b.

Die isolierten Komponenten a und b des Phäophytins zeigten unter den Bedingungen der Hydrolyse ähnliche Verhältnisse wie beim isolierten Chlorophyll a und b; als Umsatzwert des Phäophytins a wurde u zu 80, des Phäophytins b u zu 45 ermittelt.

c) Allomeres Chlorophyll a + b und seine isolierten Komponenten a und b.

Da nach WILLSTÄTTER² Berührung mit Glas auf die Allomerisation katalysierend wirkt, wurden Lösungen des Chlorophylls a + b und seiner isolierten Komponenten in 96%igem Alkohol einige Tage lang in Flaschen aus gewöhnlichem Glas belassen. Es war quantitative Allomerisation eingetreten, was sich darin äußerte, daß eine in Äther überführte Probe der Farbstoffe auf Zusatz von methylalkoholischer Kalilauge keine braune Phase gab. Die Farbstoffe wurden im Scheidetrichter in Äther überführt und, wie beim Phäophytin angegeben, zur Trockne verdampft. Die Versuche ergaben auf Grund der auf S. 296 beschriebenen Bestimmungsmethode einen überaus trägen Reaktionsverlauf, nämlich für allomeres Chlorophyll (a + b) $u = 15$. Da die Allomerisation wohl keinen allzu

¹ WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. **378**, 18 (1910).

² WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. **387**, 358 (1912).

tiefen Eingriff in das Molekül bedeutet, so ist durch dieses Ergebnis ein Beweis für die spezifische Wirkung der Chlorophyllase gegeben. Die Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit der isolierten Komponenten a und b in allomerisierter Form ergab für die a-Komponente $u = 16$, für die b-Komponente $u = 9$. Auch hier reagierte die a-Komponente also rascher als die b-Komponente.

d) Allomeres Phäophytin und seine isolierten Komponenten a und b.

Das allomere Chlorophyll a + b und seine beiden isolierten Komponenten wurden in gleicher Weise mit Säure behandelt, wie bei der Darstellung des Phäophytins aus Chlorophyll beschrieben wurde. Zur Hydrolysebestimmung diente die Basizitätsprobe. Das Ergebnis der Untersuchungen stimmt mit den beim allomeren Chlorophyll gemachten Feststellungen überein.

In folgender Tabelle sind die bisher beschriebenen Versuche mit verschiedenen Chlorophyllderivaten zusammengestellt:

Tabelle 3. 4 mg Substrat in 6 ccm 66%igem Aceton, 0,5 g extrahiertes Blattmehl von *Heracleum*. 1 Stunde, 25°.

Enzymsubstrat	a + b	a	b	HQ $\frac{a}{b}$
	u	u	u	
Chlorophyll	70	78	43	1,81
Phäophytin	69	80	45	1,78
Allomeres Chlorophyll.	15	16	9	1,78
Allomeres Phäophytin.	15	18	10	1,80

Zusammenfassend ergibt sich: Chlorophyll und Phäophytin verhalten sich gegenüber Chlorophyllase gleich, und zwar so, daß die Komponente a eine bedeutend größere Umsatzgeschwindigkeit als die Komponente b besitzt. Dieselben Verhältnisse finden sich bei den allomeren Formen, die im ganzen jedoch eine bedeutend geringere Umsetzungsgeschwindigkeit aufweisen. Besonders interessant ist die Tatsache, daß der hydrolytische Quotient aus den Umsatzwerten der isolierten Komponenten (bezeichnet mit $HQ_{\frac{a}{b}}$) in allen Fällen konstant ist (vgl. letzte Spalte der

Tabelle 3), wobei besonders darauf hinzuweisen ist, daß die isolierten Komponenten jeweils in der gleichen Konzentration vorlagen.

Die Tatsache, daß b schwerer als a hydrolysiert wird, dürfte mit einer Komplizierung in der Struktur der Komponente b zusammenhängen, wie ja nach den vorliegenden Angaben WILLSTÄTTERS das Chlorophyll b eine Oxydationsstufe des Chlorophylls a zu sein scheint. Auch NOACK und KIESSLING¹ vermuten, daß auf Grund der biologischen Beziehungen des

¹ NOACK, KURT u. KIESSLING, W.: Hoppe-Seylers Z. 182, 13 (1929).

Chlorophylls a zum Protochlorophyll das Chlorophyll b eine Oxydationsstufe des Chlorophylls a darstellt, wie dies ebenso H. FISCHER¹ annimmt.

Das unterschiedliche Verhalten der Chlorophyllase gegen die hier untersuchten Chlorophyllfarbstoffe erweist eine ausgesprochene Spezifität des Ferments, wobei zu bedenken ist, daß die durch die Chlorophyllase verseifbare Phytolestergruppe keine unmittelbare Beziehung zur Allovermerisation oder zu den sich in den a- bzw. b-Modifikationen zeigenden Strukturunterschieden haben kann. Unter diesem Gesichtspunkt kann die Chlorophyllase auch für die strukturelle Aufklärung des Chlorophylls von Bedeutung werden, wobei andererseits zu betonen ist, daß gemäß den obigen Befunden das Magnesium ohne Einfluß auf die fermentative Angreifbarkeit der Chlorophyllfarbstoffe ist.

e) *Protochlorophyll*.

In weiteren Untersuchungen wurde die Wirksamkeit der Chlorophyllase auf Protochlorophyll geprüft, das nach MONTEVERDE² und LUBIMENKO³ in den etiolierten Blättern und außerdem in den Samenhäuten von *Cucurbita* auftritt, und das nach den neueren Untersuchungen von NOACK und KIESSLING⁴ dem Chlorophyll schon sehr nahe steht, indem es eine magnesiumhaltige Reduktionsstufe des Chlorophylls darstellt, ohne daß jedoch zwei Modifikationen entsprechend dem Chlorophyll a und b nachweisbar sind.

Für die Enzymversuche mit Protochlorophyll diente als Substrat sowohl der aus etiolierten Lupinenblättern als auch aus Samenhäuten von *Cucurbita* extrahierte Farbstoff. Die Lupinen wurden in der Dunkelkammer kultiviert, die Blätter hierauf unter Lichtabschluß getrocknet und nach dem Zerreiben mit 80%igem Aceton extrahiert. Aus dem Rohextrakt wurde der Farbstoff in Äther überführt und dieser nach Entwässern bei 30° im Helmkolben abdestilliert. Die spektroskopische Untersuchung ergab Vorhandensein von Protochlorophyll neben reichlich Carotin und Xanthophyll ohne jede Spur von Chlorophyll. Aus den getrockneten und fein zerriebenen Samenhäuten von *Cucurbita* wurde das Protochlorophyll nach dem von NOACK und KIESSLING beschriebenen Verfahren als Rohprodukt gewonnen.

Als Enzympräparate kamen das vom Chlorophyll aufs sorgfältigste befreite Blattpulver von *Heracleum*, ferner das extrahierte Blattmehl etioliertes Lupinen, sowie die extrahierten Samenhäute von *Cucurbita* zur Verwendung. Die Prüfung der Einwirkung dieser Präparate auf Chloro-

¹ FISCHER, H.: Ann. d. Chem. **475**, 252 (1929).

² MONTEVERDE, N. A.: Acta Horti Petropolitani **13**, II, 201 (1894).

³ LUBIMENKO, W. u. MONTEVERDE, N. A.: Biol. Zbl. **31**, 499 (1912). — Bull. Acad. Sci. Pétersbourg, sér. **6**, 609, (1912).

⁴ NOACK, KURT u. KIESSLING, W.: Hoppe-Seylers Z. **182**, 13 (1929).

phyll a + b ergab für *Heracleum* eine gute, für *Lupinus* eine geringere, für die Samenhäute dagegen gar keine enzymatische Wirksamkeit. Die Versuchsbedingungen waren folgende: 0,5 g des betreffenden Enzympräparates wurden mit 2 ccm destilliertem Wasser und 4 ccm einer wasserfreien Acetonlösung von Protochlorophyll aus etiolierten Lupinen oder aus *Cucurbita*-Samenhäuten versetzt und die Mischung im Schüttelthermostaten 48 Stunden einer Temperatur von 25° ausgesetzt. Hierauf wurde der Farbstoff der Versuchsmischung in Äther überführt und auf etwa erfolgte Umwandlung geprüft.

Hierbei fanden grundsätzlich die gleichen Methoden Anwendung wie bei der Hydrolysebestimmung des Chlorophylls, jedoch wurde die Extraktion im einen Fall mit 0,01 n-Sodalösung, im anderen Fall mit 11% iger Salzsäure ausgeführt, wozu die von NOACK und KIESSLING gemachten Erfahrungen mit den Protochlorophyllspaltprodukten Anlaß gaben. Unter den Bedingungen der Versuche waren die Ergebnisse stets negativ: regelmäßig nahm weder die Sodalösung noch die Salzsäure auch nur Spuren des Farbstoffes auf.

Ebenso ergab sich bei Anwendung des durch Säurebehandlung vom Magnesium befreiten Protochlorophylls (Protophäophytin) keine enzymatische Spaltung.

C. Versuche nach Vorbehandlung der Enzympräparate.

a) Über die Dauer der Wirksamkeit des Enzyms.

Über die Lebensdauer des Enzyms liegen von WILLSTÄTTER¹ Angaben in dem Sinne vor, daß unter den Bedingungen der Alkohololyse schon nach fünfstündiger Versuchsdauer eine Schwächung eintritt, die er auf Enzymschädigung durch Alkohol zurückführt. Im folgenden sollen zwei Versuchsreihen unter den Bedingungen der Hydrolyse, also ohne Zusatz von Alkohol, beschrieben werden, wobei sowohl das im Blattpulver genuin vorhandene, wie auch zugesetztes Chlorophyll als Substrat dienen.

1. Versuchsreihe: In der ersten Versuchsreihe wurde auch das Aceton vermieden, um eine etwaige Schädigung durch dieses Lösungsmittel ebenfalls auszuschalten. Dabei wurde so verfahren, daß das mit Wasser vermischte Versuchsmaterial während insgesamt 72 Stunden beobachtet wurde, indem jeweils in bestimmten Portionen nach der 18., 24. Stunde usw. der bis dahin erfolgte Gesamtumsatz ermittelt wurde.

20 g grünes Blattpulver von *Heracleum* wurden mit 100 ccm destilliertem Wasser unter Zusatz von Thymol als Antisepticum zu einem Brei verrührt und im Thermostaten von 25° unter häufigerem Umrühren im ganzen 72 Stunden lang belassen. Es ergaben sich folgende Umwandlungszahlen:

¹ WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. 378, 43 (1910).

Tabelle 4. 1 g grünes Blattmehl von *Heracleum*, 5 ccm destilliertes Wasser.
Temperatur 25°.

Versuchsdauer in Stunden	0	18	24	30	48	72
u =	0	8	11	14	20	26

Die zugehörige Kurve (Abb. 3) zeigt mit zunehmender Versuchsdauer eine allmähliche Neigung zur Abszisse, die entweder durch eine Schwächung des Enzyms selbst oder durch Veränderung seiner Begleitstoffe bedingt sein kann; die Verringerung der Substratkonzentration kommt in Anbetracht der relativ geringen Umsatzgeschwindigkeit nicht bestimmend in Frage. Bemerkt sei noch, daß mit wachsender Versuchsdauer eine zunehmende Bräunung infolge Phäophytinbildung auftrat. Der p_H-Wert der abgesaugten Flüssigkeit wurde im Komparator jeweils zu 5,9 bestimmt; eine Änderung dieses Wertes trat im Verlauf von 72 Stunden nicht ein, wobei jedoch infolge der eigenartigen Beschaffenheit des Blattgewebes noch

kein Rückschluß auf die Verhältnisse im Blattpulver selbst, in dem sich die Reaktion vollzieht, erlaubt ist. Von Interesse ist außerdem, daß die Umsetzungsgeschwindigkeit in Abwesenheit von organischem Lösungsmittel trotz Anwendung von

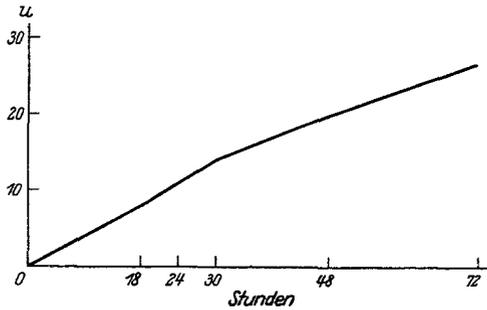


Abb. 3.

gewebeeigenem Chlorophyll sehr gering ist. Dies ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß das Chlorophyll bei Zerstörung des Chloroplasten von dessen Lipoiden aufgenommen wird, wie dies NOACK¹ beschrieben hat; hierdurch könnte ein Schutz dem Enzym gegenüber gegeben sein, der wegfällt, wenn gleichzeitig ein organisches Lösungsmittel vorhanden ist.

2. Versuchsreihe: In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Blattmehl ebenfalls 72 Stunden lang stehen gelassen und nach der 18., 24. Stunde usw. je eine Probe entnommen, die jedoch durch Extraktion mit verdünntem Aceton vom Chlorophyll befreit und nach Zugabe von Reinchlorophyll in einem einstündigen Versuch auf ihre enzymatische Wirksamkeit in 66%igem Aceton geprüft wurde. Zu diesem Zweck wurden die nach bestimmten Zeiten entnommenen Proben nach Entfernung des genuinen Chlorophylls zunächst im Exsikkator getrocknet. Dann wurden je 0,5 g des getrockneten Präparates mit 2 ccm destilliertem Wasser und einer Lösung von 4 mg Reinchlorophyll a + b in 4 ccm wasserfreiem Aceton 1 Stunde lang bei 25° geschüttelt und der Grad der enzy-

¹ NOACK, KURT: Biochem. Z. 183, 135 (1927).

matischen Hydrolyse bestimmt. Je nach der Dauer der Vorbehandlung des Versuchsgemisches ergaben sich folgende Umwandlungszahlen:

Tabelle 5. 0,5 g Blattpulver von *Heracleum* nach verschieden langer Vorbehandlung und nach Extraktion des Chlorophylls, 4 mg Reinchlorophyll a + b, 6 ccm 66%iges Aceton. Temperatur 25°.

Dauer der Vorbehandlung in Stunden	0	18	24	30	48	72
u =	79	76	75	72	69	58

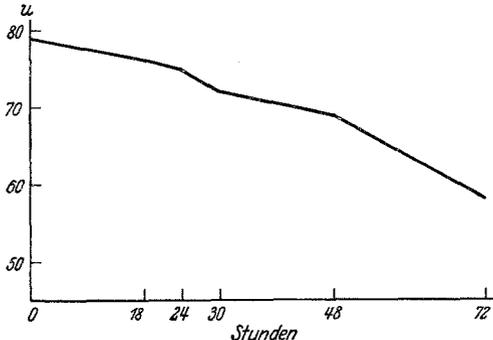


Abb. 4.

Die zugehörige Kurve (Abb. 4) zeigt mit zunehmender Dauer der Vorbehandlung ein ziemlich konstantes Sinken der enzymatischen Wirksamkeit. Die oben erwähnte Abflachung der Kurve (Abb. 3) wird also durch dieses Ergebnis bestätigt. Die Abnahme der Chlorophyllasewirkung dürfte in

den beiden Versuchsreihen wohl auf dem Altern des Enzyms beruhen, wie z. B. WILLSTÄTTER (a. a. O.) schon beim trocknen Aufbewahren des Blattpulvers allmähliche Schwächung des Enzyms beobachtet hat.

b) Versuche nach Auswaschen der Elektrolyte mit Wasser.

In einer kurzen Mitteilung aus einer bisher unveröffentlichten Untersuchung hebt WILLSTÄTTER¹ neuerdings hervor, daß das chlorophyllasehaltige Blattpulver seine Wirksamkeit völlig einbüßt, wenn ihm durch Waschen mit Wasser die Elektrolyte entzogen werden, und daß durch Zusatz von Calciumchlorid das ursprüngliche Wirkungsvermögen vollkommen wieder hergestellt wird.

Im Anschluß an diesen Befund wurden nun eingehendere Untersuchungen über die Aktivierbarkeit der Chlorophyllase angestellt. Zur Entfernung der Elektrolyte wurde das grüne Blattmehl von *Heracleum* auf einer Nutsche mit Hartfilter in dünner Schicht ausgebreitet und mit destilliertem Wasser sehr gründlich, oft tagelang ausgewaschen. Dann wurde das Chlorophyll entfernt, indem das noch feuchte Mehl auf der Nutsche mit reinstem verdünnten Aceton extrahiert wurde, und das Präparat im Vakuumexsikkator getrocknet.

Der Wirkungsgrad dieses Präparates wurde an einem Kontrollpräparat geprüft, das aus dem gleichen Blattmaterial, jedoch ohne Vorbe-

¹ WILLSTÄTTER, R.: Untersuchungen über Enzyme. I., S. 335. Berlin 1928. Ders. in OFFENHEIMER, C. u. PINCUSSEN, L.: Die Methodik der Fermente, S. 740. Leipzig 1929.

handlung mit destilliertem Wasser, dargestellt war. Dabei zeigte sich, daß die Wirksamkeit des extrahierten Präparates nicht völlig aufgehoben, wohl aber bedeutend geschwächt war, wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist.

Hierauf wurden zur Prüfung der Aktivierbarkeit durch Calciumchlorid Versuche ausgeführt, indem die beiden Versuchsmischungen mit je 5 mg Calciumchlorid versetzt und analogen Bedingungen unterworfen wurden. Bei dem mit Wasser ausgewaschenen Präparat wurde daraufhin eine Steigerung der enzymatischen Wirksamkeit beobachtet, die beinahe den ursprünglichen Wirkungsgrad des Kontrollpräparates erreichte, während letzteres durch den Calciumzusatz unbeeinflusst blieb.

Tabelle 6.

Enzympräparat mit H ₂ O extrahiert		Kontrollversuch	
	u		u
ohne CaCl ₂	46	ohne CaCl ₂	69
mit CaCl ₂	60	mit CaCl ₂	68

Die Versuche bestätigen also im Grundsatz die von WILLSTÄTTER gemachten Angaben; dagegen ist es dem Verfasser weder bei *Heraclium*, noch bei *Lamium album* und *Datura Stramonium* gelungen, die Elektrolyte durch Auswaschen so weitgehend zu entfernen, daß die Wirksamkeit der Präparate wie bei den Versuchen WILLSTÄTTERS völlig aufgehoben worden wäre.

Es wurde daher versucht, das Blattpulver auch auf andere Weise als nach dem erwähnten Nutschenverfahren auszuwaschen, z. B. nach Dialysierverfahren, durch Autolyse sowie durch Abpressen der Waschflüssigkeit; jedoch konnte völlige Inaktivierung trotz tagelanger Behandlung in keinem Fall erzielt werden. Dasselbe gilt für solche Präparate, bei deren Darstellung das Blattpulver zuerst vom Chlorophyll befreit und erst nachher mit Wasser gewaschen wurde.

Diese Ergebnisse lassen sich vielleicht dadurch erklären, daß das Blattgewebe auf Grund seiner von WILLSTÄTTER in anderem Zusammenhang betonten Adsorptionsfähigkeit die Elektrolyte adsorptiv gebunden hält, so daß es nicht ohne weiteres gelingt, sie quantitativ zu extrahieren. Für diese Auffassung spricht folgende, vom Verfasser beobachtete Erscheinung: Nach Beendigung des Auswaschens betrug der mittels Gaskettenmessung bestimmte p_H-Wert der zuletzt abgelaufenen Waschflüssigkeit 6,9, dagegen zeigte das ausgewaschene Blattpulver eine ungleich stärkere Acidität, da blaues Lackmuspapier beim Aufdrücken auf das noch feuchte Mehl gerötet wurde.

Nachdem eine Steigerung der enzymatischen Wirksamkeit durch Calciumchlorid festgestellt worden war, wurde eine größere Anzahl verschiedener Salze auf ihre aktivierende Wirkung untersucht. Diese wurden der Versuchsmischung jeweils in 0,1 molaren Lösungen zugesetzt. Zu diesen

Versuchen wurden drei verschiedene, von Elektrolyten tunlichst befreite Enzympräparate verwandt, die nach dem oben erwähnten Nutschverfahren aus grünem Blattmehl dargestellt waren, indem dieses zuerst mit destilliertem Wasser, hierauf mit verdünntem Aceton extrahiert wurde. Nacheinander wurden drei Versuchsreihen angesetzt derart, daß bei den einzelnen Versuchen jeder Reihe als Enzymmaterial stets das gleiche, in einem bestimmten Maß inaktivierte Präparat diente. Die Versuchsanordnung war folgende:

0,5 g Enzympräparat wurden mit 2 ccm einer 0,1 molaren Lösung des betreffenden Salzes versetzt. Nach dem Einsickern wurde eine Lösung von 4 mg Reinchlorophyll a+b in 4 ccm wasserfreiem reinsten Aceton zugegeben und die Mischung 1 Stunde bei 25° geschüttelt. Um zu ermitteln, wieweit das Enzym durch das Auswaschen inaktiviert worden war, wurde in jeder Reihe ein Versuch ohne Salzzusatz, also unter Verwendung von reinem Wasser, ausgeführt. Bei jedem Einzelversuch wurde ferner eine Kontrollbestimmung mit erhitztem Enzymmaterial vorgenommen, die regelmäßig negativ verlief (Tabelle 7).

Tabelle 7. 0,5 g Enzympräparat, 2 ccm Pufferlösung, 4 mg Chlorophyll, 4 ccm wasserfreies Aceton. 1 Stunde, 25°.

Salzzusatz in 0,1 mol. Lösung	Reihe 1	Reihe 2	Reihe 3
	u	u	u
Ohne Salz	46	36	30
LiCl	66	58	61
NaCl	65	53	59
KCl	67	45	57
KCN	0	—	0
KMnO ₄	59	—	51
NH ₄ Cl	56	50	—
NH ₄ NO ₃	—	48	—
(NH ₄ COO) ₂	—	38	—
CaCl ₂	60	45	51
Ca(NO ₃) ₂	—	38	—
BaCl ₂	57	44	—
MgCl ₂	51	—	48
MgSO ₄	—	42	—
ZnSO ₄	—	41	38
CuSO ₄	32	—	19
Ferro-Lactat	54	—	48
Ferro-Ammoncitrat	—	—	45

Die Ergebnisse der Tabelle 7 zeigen, daß die Wirkung der teilweise inaktivierten Enzympräparate außer durch Calciumchlorid auch durch andere Salze beeinflußt werden kann: Von allen zugesetzten Salzen wirkten am günstigsten die Chloride der Alkalimetalle, nämlich Lithiumchlorid, Kaliumchlorid und Natriumchlorid, weniger gut die Chloride der

Erdalkalien und des Magnesiums. Auch Kaliumpermanganat wirkte fördernd. Schwermetallsalze hatten ebenfalls einen Einfluß, indem Zinksulfat und Eisen(II)Salze die Enzymwirkung schwach förderten, Kupfersulfat dagegen hemmte, was vielleicht auf Verringerung des p_H -Wertes zurückzuführen ist. Durch Cyankali wurde die enzymatische Wirksamkeit der Präparate vollkommen aufgehoben. Wie jedoch weiter unten dargelegt wird, trat Cyanhemmung nur bei Verwendung solcher Enzympräparate auf, die, wie in den vorliegenden Fällen, durch Auswaschen schon zu einem Teil inaktiviert worden waren. Zu bemerken ist noch, daß die aktivierende Wirkung der Nitrate etwas geringer war als die der Chloride. Man kann daher wohl bei den meisten der erwähnten Aktivatoren nicht nur dem Kation, sondern auch dem Anion eine aktivierende Funktion zuschreiben. Eine besonders günstige Kombination von aktivierender Kationen- und Anionenwirkung ist somit wohl bei den Chloriden der Alkalimetalle gegeben. Ob allerdings die zugesetzten Salze tatsächlich eine spezifische Wirkung auf das Enzym ausüben, also im Sinne von reinen Aktivatoren wirken, ist nicht ohne weiteres zu entscheiden. Es war nämlich die Möglichkeit gegeben, daß bei Salzzusatz die p_H -Verhältnisse sich änderten und dadurch die Wirkungsweise des Enzyms beeinflußt wurde. Nun ergaben zwar p_H -Messungen, die in den Versuchsmischungen mit Hilfe der Gaskettenmethode ausgeführt wurden, bei Zusatz verschiedener Salze geringe Unterschiede der p_H -Werte; jedoch ist es im Hinblick auf die oben erwähnte Adsorptionsfähigkeit des Blattgewebes nicht wahrscheinlich, daß dadurch die Enzymwirkung beeinflußt wurde. Durch Pufferversuche, die Verfasser unter Verwendung eines teilweise inaktivierten Chlorophyllasepräparates anstellte, konnte jedenfalls eine derartige Beziehung nicht hergestellt werden, da in Übereinstimmung mit den auf S. 297 beschriebenen Versuchen die enzymatische Wirksamkeit des Präparates innerhalb eines großen p_H -Bereichs keine nennenswerte Änderung erfuhr.

Etwas genauer wurde der Einfluß von Eisen(II)salz untersucht: Einer Versuchsmischung mit einem elektrolytarmen Enzympräparat wurde Eisen(II)lactat in verschiedener Verdünnung, zum Teil nur in Spuren, zugesetzt. Dabei konnte noch bei Gegenwart von 0,001 mol. Ferrosalz eine Steigerung der Enzymwirkung von $u = 30$ auf $u = 36$ festgestellt werden, während in noch höherer Verdünnung keine Beeinflussung des Enzyms mehr beobachtet wurde. Eisen(II)salz wirkt nicht unmittelbar auf Chlorophyll, da in einer erhitzten Kontrollportion, die mit derselben Eisenmenge versetzt worden war, keine Spaltung des Chlorophylls eingetreten war.

Ebenso wie bei den weiter oben beschriebenen Versuchen mit Calciumchlorid war es auch durch die in der Tabelle 7 angeführten Alkalisalze nicht möglich, in nicht ausgewaschenen Präparaten die Enzym-

wirkung über die Norm hinaus zu steigern. Der Umsatz betrug in allen Fällen $u = 74$ wie in den Kontrollversuchen ohne Salzzusatz.

Auffallend ist besonders, daß Cyankali in dem nicht von Salzen befreiten Blattpulver keine Hemmung der enzymatischen Wirksamkeit verursachte, was vielleicht auf eine komplexe Anlagerung des Cyankalis an die nicht ausgewaschenen Substanzen zurückzuführen ist: In einem Versuch mit nicht ausgewaschenem Blattpulver unter Zusatz von 0,1 mol. Cyankali war der Umsatz mit $u = 74$ genau so groß wie in der cyankali-freien Kontrolle.

c) *Versuche nach Vorbehandlung der Enzympräparate mit Salzsäure, Ammoniak und Cyankali.*

Zur Klärung der Frage, ob die Wirksamkeit der Chlorophyllase in ähnlicher Weise, wie dies bei anderen Enzymen beobachtet worden ist, durch Vorbehandlung mit Säuren, Alkalien und Cyansalz beeinflusst wird, wurden Versuche mit dem vom Chlorophyll befreiten Blattpulver von *Heracleum* angestellt.

1. *Vorbehandlung mit Salzsäure.* Je 2 g chlorophyllfreies Blattpulver wurden mit 20 ccm Salzsäure verschieden abgestufter Konzentration 2 Stunden lang geschüttelt, hierauf auf einer kleinen Nutsche gesammelt und so lange mit destilliertem Wasser gewaschen, bis in der ablaufenden Flüssigkeit mit Silbernitratlösung kein Chlor mehr nachgewiesen werden konnte. Doch ist anzunehmen, daß infolge der früher erwähnten Adsorptionswirkung des Blattgewebes in den ausgewaschenen Präparaten noch wechselnde Mengen von Salzsäure in adsorptiver Bindung vorhanden waren, die jedoch nur gering sein konnten, da das nach dem Auswaschen zugesetzte Chlorophyll keine Spur von Phäophytinbildung zeigte. Ohne diese Verhältnisse zu berücksichtigen, wurden hierauf die Präparate mit wasserfreiem Aceton kurz nachgewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet.

Zu jedem Versuch wurden 0,5 g der so vorbehandelten Enzympräparate mit 2 ccm destilliertem Wasser und mit 4 ccm wasserfreiem Aceton, das 4 mg Chlorophyll a + b gelöst enthielt, 1 Stunde bei 25° geschüttelt, worauf folgende Umsatzwerte ermittelt wurden:

Mol. HCl	0	0,01	0,025	0,05	0,1	0,25	0,5	2,5
u =	73	72	70	71	62	49	34	5

2. *Vorbehandlung mit Ammoniak.* Diese wurde wie mit Salzsäure in verschiedener Verdünnung vorgenommen und das Auswaschen so lange fortgesetzt, bis mit NESSLERS Reagens kein Ammoniak mehr nachzuweisen war. Die Versuchsbedingungen waren die gleichen wie oben. Folgende Umsatzwerte wurden ermittelt:

Mol. NH ₃	0	0,06	0,3	0,6	1,2	6
u =	73	54	51	42	9	0

Das Enzym zeigte sich also gegenüber verdünnter Salzsäure ziemlich resistent, indem nach zweistündiger Einwirkung einer 0,05 mol. Säure noch keine Schwächung eintrat. Dagegen bewirkte eine 0,06 mol. Ammoniaklösung schon eine erhebliche Schädigung. In beiden Fällen kann diese Wirkung nicht auf einer Elution von Elektrolyten aus dem Blattgewebe beruhen, da sich in Kontrollversuchen zeigte, daß nachträglicher Zusatz von Kaliumchlorid auch bei den stärksten angewandten Salzsäure- bzw. Ammoniakkonzentrationen keinen Wiederanstieg der Enzymwirkung zur Folge hatte.

3. *Vorbehandlung mit Cyankali.* Bei den Versuchen mit Cyankali wurde das Präparat nur einer Vorbehandlung mit 0,1 mol. Lösung unterworfen und wegen der hohen Giftigkeit sehr lange ausgewaschen: 10 g des chlorophyllfreien Blattpulvers wurden mit 100 ccm dieser Cyankalilösung 12 Stunden lang geschüttelt und nach Auswaschen mit destilliertem Wasser und kurzem Nachwaschen mit Aceton getrocknet. Zum Vergleich wurden weitere 10 g des Blattmehls mit destilliertem Wasser ohne Cyankalizusatz geschüttelt und im übrigen ebenso behandelt. Um eine Störung der Versuche durch Elektrolytelution zu kontrollieren, wurde in einem Teil der Versuche 0,1 mol. Kaliumchloridlösung zugesetzt.

Die Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche, sowohl nach Vorbehandlung des Blattmehls mit Cyankali wie auch nach Vorbehandlung mit reinem Wasser.

Tabelle 8. 0,5 g Enzympräparat, 2 ccm Wasser bzw. Kaliumchloridlösung, 4 mg Reinchlorophyll a + b, 4 ccm wasserfreies Aceton. 1 Stunde, 25°.

Enzympräparat mit KCN vorbehandelt		Kontrollpräparat mit Wasser vorbehandelt	
	u		u
ohne KCl	41	ohne KCl	62
mit KCl	64	mit KCl	71

Die zwölfstündige Vorbehandlung mit 0,1 mol. Cyankalilösung hatte also in dem chlorophyllfreien Blattpulver eine relativ geringe Schädigung der enzymatischen Wirksamkeit zur Folge. Ob noch Reste von Cyanid im Blattgewebe adsorptiv gebunden waren, entzog sich der Beurteilung. Da, wie auf S. 316 beschrieben ist, eine Hemmung durch Cyankali, soweit es *während* der enzymatischen Einwirkung angewandt wird, nur bei Salzarmut des Blattgewebes zutage tritt, dürfte die relativ geringe Hemmung nach *Vorbehandlung* mit Cyankali ebenso wie dort auf komplexer Abbindung des Enzymgifts beruhen. Inwiefern diese Verhältnisse durch eine etwaige Reversibilität der Cyankaliwirkung beeinflusst werden, wurde nicht untersucht.

D. Versuche nach Wärmeverbehandlung frischer Blätter.

Nachdem schon WILLSTÄTTER¹ auf die Wärmeempfindlichkeit der Chlorophyllase hingewiesen, jedoch keine genaueren Angaben gemacht hat, wurde weiterhin der Einfluß kurzer Erwärmung auf die enzymhaltigen Blätter von *Heracleum* untersucht. Diese wurden in frischem, also wasserhaltigem Zustand 10 Minuten lang im Thermostaten verschieden hohen Temperaturen ausgesetzt, unmittelbar hierauf im Exsikkator bei Zimmertemperatur getrocknet und zerrieben. Die so vorbehandelten Präparate wurden durch Extraktion mit verdünntem Aceton vom Chlorophyll befreit und im Vakuumexsikkator kurz getrocknet. Hierbei wurden — besonders was die Dauer der Berührung mit Aceton betrifft — bei den verschiedenen Präparaten stets die gleichen Bedingungen eingehalten.

Je 0,5 g des durch verschieden hohes Erhitzen vorbehandelten Enzymmaterials wurden mit 2 ccm Wasser und 4 ccm einer Lösung von 4 mg Chlorophyll a + b in wasserfreiem Aceton versetzt und die Mischung im Thermostaten 1 Stunde lang bei 25° geschüttelt.

Die Umsatzwerte waren für 10 Minuten lange Vorerwärmung:

	30°	40°	50°	60°	70°	80°
u =	84	84	86	49	42	31

Demnach bewirkte eine Temperatureinwirkung von 10 Minuten schon bei 60° eine beträchtliche Schädigung des Enzyms, obwohl sich dieses noch im Verband mit dem Blattgewebe befand. WILLSTÄTTER² gibt auf Grund eines Alkoholysesversuches an, daß ein extrahiertes *Heracleum*-Präparat nach 40 Minuten langem Kochen mit 96%igem Alkohol einen Umsatzwert von $u = 17,4$ gegenüber $u = 43,7$ in einem Kontrollversuch zeigte.

Zweiter Abschnitt.

Biologische Untersuchungen.

Vorbemerkung.

WILLSTÄTTER stellte in zahlreichen von ihm untersuchten Pflanzen, die den verschiedensten Familien und Standorten angehörten, regelmäßig Chlorophyllase fest, wobei sich jedoch starke Unterschiede in der Enzymmenge sowohl zwischen einzelnen Pflanzenarten als auch beim Vergleich verschiedener Ernten ein und derselben Art ergaben. Unter den häufig vorkommenden Arten fand WILLSTÄTTER³ verhältnismäßig wenige, die einen hohen Enzymgehalt aufweisen, z. B. *Heracleum Sphondylium*, *Gale-*

¹ WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Untersuchungen über Chlorophyll, S. 179. Berlin 1913.

² WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. 378, 49 (1910).

³ WILLSTÄTTER, R.: Untersuchungen über Enzyme. I., S. 334. Berlin 1928. Ders. in OPPENHEIMER, C. u. PINCUSSEN, L.: Die Methodik der Fermente, S. 739. Leipzig 1929.

opsis Tetrahit, Stachys silvatica, Datura Stramonium, Lamium maculatum. Da WILLSTÄTTER nur in wenigen Fällen Zahlenwerte des Umsatzes angibt und die verschiedenen Werte keinen Vergleich im großen Rahmen erlauben, sollen im folgenden Versuche beschrieben werden, in denen eine Reihe von Pflanzen unter gleichmäßigen Versuchsbedingungen auf ihren Chlorophyllasegehalt geprüft wurden. Außerdem wurden verschiedene andere Gesichtspunkte wie jahreszeitliches Verhalten, Entwicklungsstadium und andere physiologische Besonderheiten berücksichtigt.

A. Der Chlorophyllasegehalt verschiedener Pflanzen zur gleichen Jahreszeit.

Im Mai 1928 wurden die ausgewachsenen Blätter von insgesamt 59 beliebigen Arten geerntet und bei Zimmertemperatur getrocknet. 2 bis 3 Tage nach der Ernte wurden sie zu feinem Pulver zerrieben und gelangten unmittelbar darauf zur Untersuchung, wobei als Enzymsubstrat ihr eigenes Chlorophyll diente.

0,5 g des betreffenden grünen Blattmehls wurden im Reagensglas zunächst 5 Minuten lang mit 4 ccm wasserfreiem Aceton geschüttelt, wodurch ein großer Teil des Chlorophylls extrahiert wurde. Hierauf wurden 2 ccm destilliertes Wasser zugesetzt und die etwa 66% Aceton enthaltende Mischung im Thermostaten 1 Stunde lang bei 25° geschüttelt. Die Lösung wurde auf einer kleinen Nutsche abgesaugt und der Rückstand mit etwa 20 ccm 90%igem Aceton in kleinen Anteilen rasch extrahiert. Aus dem Extrakt wurden die Farbstoffe im Schütteltrichter durch Entmischen mit Wasser in 30 ccm Äther übergeführt und die ätherische Lösung durch häufiges Auswaschen von wasserlöslichen Begleitstoffen völlig befreit. In dieser Lösung wurde hierauf die durch Enzymwirkung verursachte Hydrolyse des Chlorophylls durch colorimetrischen Vergleich der Chlorophyllinsalze bestimmt.

In Kontrollversuchen wurde jedesmal festgestellt, daß das Blattgemisch vor dem Hydrolyseversuch völlig frei von Chlorophyllspaltprodukten war. Die quantitative Bestimmung ergab für die untersuchten Pflanzen die in Tabelle 9, S. 320, mitgeteilten Umwandlungszahlen.

Zunächst läßt sich aus der Tabelle 9 entsprechend den Befunden WILLSTÄTTERS das Vorhandensein von Chlorophyllase in allen untersuchten Arten entnehmen. In den quantitativen Verhältnissen ergaben sich jedoch — ebenfalls in Übereinstimmung mit WILLSTÄTTER — sehr weitgehende Verschiedenheiten. Irgendwelche systematische und ökologische Zusammenhänge lassen sich auf Grund dieser Unterschiede nicht konstruieren, doch scheint es, daß Umbelliferen, Labiaten und Solanaceen im allgemeinen viel, die Monokotylen dagegen wenig Chlorophyllase enthalten. Auch ist auffallend, daß alle untersuchten tropischen Gewächse sehr niedrige Chlorophyllasezahlen aufweisen, obwohl sie zumeist

Tabelle 9. 1 g grünes Blattpulver, 6 ccm 66%iges Aceton. 1 Stunde, 25°.

Blattpulver aus	u	Blattpulver aus	u
<i>Selaginella Kraussiana</i>	3	<i>Anthriscus silvestris</i>	82
<i>Aspidium filix mas</i>	26	<i>Chaerophyllum aureum</i>	80
<i>Ginkgo biloba</i>	3	<i>Archangelica officinalis</i>	75
<i>Platanus orientalis</i>	4	<i>Levisticum officinale</i>	65
<i>Spinacia oleracea</i>	24	<i>Daucus carota</i>	11
<i>Rheum rhaponticum</i>	16	<i>Cynoglossum officinale</i>	26
<i>Rumex acetosa</i>	4	<i>Lamium album</i>	83
<i>Amarantus retroflexus</i>	72	<i>Galeopsis Tetrahit</i>	81
<i>Ficus Cannonii</i>	6	<i>Stachys silvatica</i>	80
<i>Cannabis sativa</i>	27	<i>Satureja vulgaris</i>	45
<i>Urtica urens</i>	8	<i>Salvia officinalis</i>	36
<i>Carpinus betulus</i>	6	<i>Salvia verticillata</i>	31
<i>Corylus avellana</i>	17	<i>Ballota nigra</i>	30
<i>Chelidonium maius</i>	18	<i>Brunella vulgaris</i>	29
<i>Viola odorata</i>	19	<i>Nepeta grandiflora</i>	22
<i>Potentilla recta</i>	44	<i>Betonica officinalis</i>	20
<i>Lupinus polyphyllus</i>	40	<i>Datura Stramonium</i>	86
<i>Phaseolus vulgaris</i>	8	<i>Nicotiana tomentosa</i>	20
<i>Vicia Faba</i>	12	<i>Digitalis purpurea</i>	36
<i>Pisum sativum</i>	19	<i>Cucurbita Pepo</i>	2
<i>Robinia pseudacacia</i>	18	<i>Taraxacum officinale</i>	11
<i>Tilia platyphyllos</i>	46	<i>Dahlia variabilis</i>	79
<i>Dombeya Wallichii</i>	8	<i>Arum maculatum</i>	12
<i>Rhus typhina</i>	24	<i>Scilla bifolia</i>	10
<i>Acer campestre</i>	38	<i>Gras</i>	3
<i>Aesculus hippocastanum</i>	41	<i>Avena sativa</i>	2
<i>Sparmannia africana</i>	27	<i>Zea Mays</i>	4
<i>Hedera Helix</i>	12	<i>Hemerocallis fulva</i>	6
<i>Heracleum Sphondylium</i>	90	<i>Musa sapientium</i>	4
<i>Myrrhis odorata</i>	88		

reichlich Chlorophyll führen. Übrigens sei bemerkt, daß sich das Vorkommen von Chlorophyllase nicht allein auf die Blätter beschränkt; vielmehr konnte das Enzym auch in anderen grünen Teilen, wie Stengeln und Blattstielen, und auch in Wurzeln nachgewiesen werden (vgl. auch S. 325).

In Kontrollversuchen wurden die obigen Ergebnisse insofern sichergestellt, als die Mitwirkung von Elektrolytsalzen und die p_{H} -Verhältnisse berücksichtigt wurden:

1. Um die an sich nicht wahrscheinliche Möglichkeit auszuschließen, daß die beobachteten Unterschiede im Chlorophyllasegehalt durch verschiedenen Elektrolytgehalt bedingt sind, wurde eine Reihe von Pflanzen, besonders diejenigen mit geringen Umsatzwerten, nach Zusatz von Calciumchlorid geprüft. In keinem Fall ergab sich jedoch eine Erhöhung der Umsatzzahlen (vgl. auch S. 315f.).

2. Um eine an sich mögliche Trübung der Ergebnisse durch abnorme p_{H} -Bedingungen in den einzelnen Pflanzen auszuschließen, wurde eine

Reihe von Pflanzen mit extremen u -Werten, sowie eine Pflanze mit extremem p_H -Wert (*Rheum*) herausgegriffen und die jeweilige Umsatzzahl unter Verwendung der früher beschriebenen *Chloroplastenmasse* bestimmt, da, wie auf S. 297 angegeben ist, das stark adsorbierende Blattpulver für Pufferungsversuche nicht geeignet ist. Aus frischem Blattmaterial wurde eine Aufschwemmung destrukturierter Chloroplasten hergestellt, wobei jedoch die Blätter an Stelle von Wasser mit so viel Pufferlösung zerrieben wurden, daß der p_H -Wert der Flüssigkeit ungefähr bei dem als Optimum festgestellten Wert ($p_H = 6,0$) lag. Hierauf wurde die Flüssigkeit mit Wasser so weit verdünnt, daß auf einen Gewichtsteil frisches Blatt drei Volumteile Flüssigkeit kamen. Als Puffer wurden Mischungen von 0,1 n-Ammoniumchlorid mit 0,1 n-Ammoniak bzw. -Salzsäure verwandt¹ und die p_H -Messungen nach der Gaskettenmethode vorgenommen. Zur Kontrolle wurde derselbe Versuch *ohne* Pufferzusatz angesetzt.

Untersucht wurden Blätter von *Rheum*, *Zea Mays*, *Platanus*, *Urtica*, *Lamium*, *Datura*, *Heracleum*, die im Juni geerntet wurden. 5 ccm der Chloroplastenaufschwemmung wurden mit 10 ccm wasserfreiem Aceton versetzt und die Mischung im Thermostaten 4 Stunden lang bei 25° geschüttelt. Da das Enzym sehr stark verdünnt war, mußte der Versuch länger als üblich ausgedehnt werden. Die in der Tabelle 10 angegebenen p_H -Werte beziehen sich auf eine erneute Messung unmittelbar vor der Hydrolyse, da der Acetonzusatz häufig eine geringe Änderung des p_H -Wertes bedingte.

Tabelle 10. 5 ccm Chloroplastenaufschwemmung, 10 ccm wasserfreies Aceton. 4 Stunden, 25°.

Blattmaterial (Chloroplastenmasse)	Hauptversuch mit Pufferung		Kontrollvers. ohne Pufferung	
	p_H	u	p_H	u
<i>Rheum rhaponticum</i> . .	6,4	17	4,3	13
<i>Zea Mays</i>	5,9	3	5,6	3
<i>Platanus orientalis</i> . .	5,9	5	5,3	5
<i>Urtica urens</i>	6,6	7	7,7	6
<i>Lamium album</i>	6,0	46	6,6	44
<i>Datura Stramonium</i> . .	6,0	51	6,0	52
<i>Heracleum Sphondylium</i>	6,0	46	5,9	46

Vergleicht man zunächst die Umwandlungszahlen der ohne Pufferzusatz angeführten Versuche mit den entsprechenden Werten der Tabelle 9, so ergibt sich hinsichtlich des Chlorophyllasegehalts eine gewisse Übereinstimmung, obwohl ja bei den vorliegenden Versuchen Enzympräparate anderer Art verwandt worden sind. Der Vergleich mit den

¹ Vgl. RONA, P.: Praktikum der physiologischen Chemie. I., S. 54. Berlin 1926.

Pufferversuchen in Tabelle 10 dagegen zeigt, daß bei dem säurereichen *Rheum* die Erhöhung des ursprünglich vorhandenen p_H -Wertes von 4,3 auf $p_H = 6,4$ eine Steigerung der enzymatischen Wirksamkeit zur Folge hatte, während bei den übrigen Pflanzen die Unterschiede zwischen den beiden p_H -Werten so gering waren, daß eine p_H -Abhängigkeit nicht deutlich in Erscheinung trat. Interessant ist, daß die *Urtica*-Präparate einen im alkalischen Gebiet liegenden p_H -Wert aufwiesen, wie auch SMALL¹ auf die ausgesprochen alkalische Reaktion der Sproßepidermis von *Urtica* hinweist.

Aus diesen beiden Kontrollversuchen ergibt sich, daß die starken Unterschiede in den Umsatzwerten, wie sie in Tabelle 9 niedergelegt sind, tatsächlich auf Unterschiede im Chlorophyllasegehalt zurückzuführen sind. Infolgedessen wurden in den im folgenden beschriebenen Versuchen diese Kontrollen nicht mehr ausgeführt.

B. Der Chlorophyllasegehalt in verschiedenem Blattmaterial derselben Art.

a) Der Chlorophyllasegehalt einiger Pflanzenarten zu verschiedenen Jahreszeiten.

Beim Vergleich verschiedener Ernten von *Heracleum* hat WILLSTÄTTER² bereits Unterschiede des Chlorophyllasegehalts festgestellt, indem er an Blättern vom Mai und vom Juli unter den Bedingungen der Alkohololyse Umwandlungszahlen von $u = 65$ bzw. $u = 35$ beobachtete. Da jedoch das Alter der Blätter verschieden war, kann aus diesen Zahlen nicht ohne weiteres auf den alleinigen Einfluß der Jahreszeit geschlossen werden, um so weniger, als er beim Vergleich der jungen und älteren Blätter, die beide im gleichen Monat (Anfang und Ende Mai) geerntet waren, ebenfalls verschiedene Umwandlungszahlen erhielt, nämlich unter gewissen Versuchsbedingungen $u = 24$ bzw. $u = 44$. Untersuchungen des Verfassers über die Abhängigkeit des Enzymgehaltes vom Alter der Blätter werden auf S. 323f. mitgeteilt.

Für die folgenden Versuche wurden möglichst gleichaltrige Blätter verwandt, die von mehreren Pflanzenarten zu verschiedenen Jahreszeiten geerntet worden waren. Die ausgewachsenen grünen Blätter wurden 1928 jeweils im Mai, Juli und September, einige auch im November, geerntet und nach 2—3 Tagen, unmittelbar nach dem Trocknen, untersucht. Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei den in Abschnitt A mitgeteilten Chlorophyllasebestimmungen. Es ergaben sich die in Tabelle 11 mitgeteilten Umwandlungszahlen.

Im Juli zeigte sich also fast durchweg eine bedeutende Abnahme der

¹ SMALL, J.: Hydrogen-Ion Concentration in Plant Cells and Tissues. Proto-plasma-Monographien, II, S. 117. Berlin 1929.

² WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. 378, 51, 63 (1910).

Tabelle 11.

Blattpulver aus	Mai u	Juli u	Sept. u	Nov. u
<i>Chelidonium maius</i>	18	7	16	—
<i>Viola odorata</i>	19	13	12	—
<i>Potentilla recta</i>	44	19	38	—
<i>Tilia platyphyllos</i>	46	8	34	—
<i>Acer campestre</i>	38	22	32	26
<i>Aesculus hippocastanum</i>	41	5	18	—
<i>Hedera Helix</i>	12	3	10	9
<i>Heracleum Sphondylium</i>	90	30	78	72
<i>Myrrhis odorata</i>	88	42	76	—
<i>Chaerophyllum aureum</i>	80	16	68	—
<i>Archangelica officinalis</i>	75	17	73	—
<i>Levisticum officinale</i>	65	11	62	—
<i>Lamium album</i>	83	33	74	65
<i>Stachys silvatica</i>	80	26	58	—
<i>Salvia officinalis</i>	36	24	29	—
<i>Ballota nigra</i>	30	17	24	—
<i>Brunella vulgaris</i>	29	30	28	—
<i>Nepeta grandiflora</i>	22	23	18	—
<i>Betonica officinalis</i>	20	8	22	—

enzymatischen Wirksamkeit, während im September wieder eine Steigerung auftrat, die in vielen Fällen sogar annähernd den im Mai beobachteten Höchstwert erreichte. Im November war wieder eine geringe Abnahme des Chlorophyllasegehalts zu verzeichnen.

Wenn die Chlorophyllase, wie anzunehmen ist, bei der natürlichen Synthese oder beim Abbau des Chlorophylls eine Funktion ausübt, so lassen sich die in der Tabelle 11 angegebenen Befunde mit dieser natürlichen Funktion des Enzyms insofern in Einklang bringen, als im Frühjahr, d. h. zur Zeit der Chlorophyllbildung, sowie im Herbst, in dem das Chlorophyll allmählich aus den Blättern verschwindet, mehr Chlorophyllase vorhanden ist als im Sommer. Allerdings ist zu betonen, daß auch bei dem immergrünen Efeu dieselbe Erscheinung vorlag, ohne daß hier von reichlichem Chlorophyllabbau im Herbst wohl die Rede sein kann.

b) Blätter in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Im September 1928 wurden gleichzeitig ganz junge Blattknospen von *Heracleum*, deren Blätter nicht länger als 5 cm waren, außerdem junge Blätter von 5—10 cm Länge und endlich ausgewachsene Blätter von mehr als 20 cm Länge getrennt gesammelt und getrocknet. Die Chlorophyllasebestimmungen wurden wiederum unter Verwendung des grünen Blattpulvers ohne vorherige Entfernung des Chlorophylls vorgenommen, indem die gleichen Versuchsbedingungen eingehalten wurden wie bei den Versuchen im Abschnitt A.

Je 0,5 g des grünen Blattmehls wurden mit 4 ccm wasserfreiem Aceton und 2 ccm destilliertem Wasser versetzt und 1 Stunde bei 25° geschüttelt. Es ergaben sich folgende Umwandlungszahlen:

Länge der Blätter	< 5	5—10	> 20 cm
u =	32	68	79

Der Enzymgehalt der ganz jungen Blätter war also bedeutend geringer als bei etwas älteren Blättern während derselben Jahreszeit.

c) *Grüne und verfärbte Blätter im Herbst.*

Von mehreren Pflanzenarten wurden im Herbst gleichzeitig die noch rein grünen, ferner solche Blätter, die sich im Stadium der beginnenden Verfärbung befanden, und endlich vollständig verfärbte Blätter getrennt gesammelt. Nach dem Trocknen wurden sie zu feinem Pulver zerrieben und die verschiedenen Pulver jeweils unter genau gleichen Bedingungen mit verdünntem Aceton extrahiert (vgl. S. 295). Die Versuchsmischung, die aus 0,5 g von Chlorophyll befreitem Blattmehl, 4 mg Reinchlorophyll a + b und 6 ccm 66%igem Aceton bestand, wurde im Thermostaten 1 Stunde lang bei 25° geschüttelt, worauf die enzymatische Umwandlung bestimmt wurde.

Bestimmungen an herbstlich verfärbten Blättern machen insofern gewisse Schwierigkeiten, als sich dabei gelbe und rote Begleitstoffe in verstärktem Maße anreichern, die in Wasser schwer löslich sind. Da es sich um Flavonole, Anthocyane und andere alkalilösliche Bestandteile handelt, so gelang es, diese Stoffe durch Auswaschen der ätherischen Farbstofflösung mit einer Lösung von sekundärem Natriumphosphat zu entfernen.

Tabelle 12. 0,5 g chlorophyllfreies Blattpulver, 4 mg Chlorophyll, 6 ccm 66%iges Aceton. 1 Stunde, 25°.

Blattmaterial	grün	teilweise vergilbt	vergilbt
	u	u	u
<i>Cannabis sativa</i>	20	17	15
<i>Tropaeolum minus</i>	10	9	6
<i>Aesculus hippocastanum</i>	15	12	7
<i>Heracleum Sphondylium</i>	74	51	28
<i>Siler biloba</i>	37	24	8
		teilweise gerötet	gerötet
<i>Rumex Acetosa</i>	4	3	1
<i>Amarantus retroflexus</i>	60	53	49
<i>Rhus typhina</i>	7	6	4
<i>Ampelopsis quinquefolia</i>	17	11	9

Bei sämtlichen untersuchten Arten zeigte sich also im Stadium der herbstlichen Verfärbung nicht, wie an sich denkbar war, eine Steigerung, sondern eine Abnahme der enzymatischen Wirksamkeit.

Außerdem kamen total abgestorbene, braune Blätter von *Aesculus hippocastanum* und anderen Pflanzen zur Untersuchung. Bei diesen konnte überhaupt keine Chlorophyllasewirkung mehr festgestellt werden, auch dann nicht, wenn die Versuche unter Zusatz von Phosphatpuffer in Lösungen von verschieden abgestuften p_H -Werten ausgeführt wurden.

d) *Panaschierte Blätter.*

Die grünen und weißen Teile panaschiertes Blätter von *Hemerocallis fulva* sowie von *Panicum variegatum* wurden voneinander sorgfältig getrennt und hierauf getrocknet. Nach dem Zerreiben wurden sowohl die grünen als auch die weißen Pulver unter analogen Bedingungen mit verdünntem Aceton extrahiert und sogleich nach dem Trocknen untersucht:

Tabelle 13. 0,5g extrahiertes Blattpulver, 4 ccm 0,1%ige Lösung von Reinchlorophyll a + b in wasserfreiem Aceton, 2 ccm Wasser. 1 Stunde, 25°.

Präparate von	grünen Teilen u	weißen Teilen u
<i>Hemerocallis fulva</i>	5	3
<i>Panicum variegatum</i>	8	4

Bemerkenswerterweise enthalten demnach auch die weißen Teile panaschiertes Blätter trotz ihres äußerst geringen Chlorophyllgehaltes nicht unbeträchtliche Enzymmengen.

e) *Chlorophyllasehaltige Wurzeln.*

In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß auch in Wurzeln Chlorophyllase zu finden ist. 1 g des Mehls aus getrockneten Wurzeln von *Heracleum Sphondylium* und *Lamium album* wurde mit je 4 mg Chlorophyll a + b und 6 ccm 66%igem Aceton zum Versuch angesetzt. Nach sechsständiger Versuchsdauer ergab sich eine teilweise Hydrolyse des Chlorophylls, indem der Grad der Umwandlung, d. h. u, für das Präparat aus *Heracleum* 11, aus *Lamium* 8 betrug. Diese Tatsache ist wohl damit in Beziehung zu bringen, daß die Wurzeln bei Belichtung ergrünungsfähig sind¹. Kontrollversuche mit erhitztem Material verliefen in beiden Fällen negativ.

Bei Verwendung der getrockneten Wurzeln von *Daucus carota* konnte unter denselben Bedingungen keine Hydrolyse festgestellt werden, was wahrscheinlich mit dem in Tabelle 9 angegebenen geringen Enzymgehalt in den Blättern dieser Pflanze zusammenhängt.

C. Blätter von vorbehandelten Versuchspflanzen.

a) *Blätter im Dunkeln ausgebleicht.*

Die Vergilbung der Blätter im Herbst, die als eine Alterserscheinung aufzufassen ist, kann nach PFEFFER² an geeigneten Versuchspflanzen

¹ Vgl. z. B. SIEBERT, A.: Beih. Bot. Zbl. 37, Abt. 1, 207 (1920).

² PFEFFER, W.: Pflanzenphysiologie, I, S. 318. Leipzig 1881.

auch künstlich durch nachträgliches Verdunkeln der grünen Pflanzen hervorgerufen werden. Nach MOLISCH¹ wird die bei Lichtabschluß auftretende Ausbleichung des Chlorophylls durch Kultivieren der Pflanzen bei höherer Temperatur sowie durch Nahrungsentzug wesentlich beschleunigt.

Für die Versuche wurden jeweils mehrere Töpfe mit den unten verzeichneten Arten in den Dunkelraum gebracht, während die Vergleichspflanzen im diffusen Tageslicht belassen wurden. Die Temperatur betrug in beiden Fällen 20—25°. Das Begießen wurde ziemlich selten und stets in gleicher Weise vorgenommen. Die Ausbleichung der Versuchspflanzen war beendet bei

	<i>Tropaeolum maius</i>	<i>Sparmannia africana</i>	<i>Avena sativa</i>
nach	2	4	6 Wochen

Bei *Aesculus hippocastanum* und *Acer campestre* waren die Blätter der Versuchspflanzen bei Abbruch der Dunkelbehandlung, d. h. nach 6 Wochen, etwas gebräunt, das Chlorophyll jedoch nicht vollkommen ausgebleicht.

Die Blätter der Versuchspflanzen wurden unter Lichtabschluß getrocknet, die der Kontrollpflanzen am Licht. Das Blattpulver der zum Teil ausgebleichten Versuchspflanzen, wie auch der grünen Kontrollpflanzen wurde unter gleichen Bedingungen mit verdünntem Aceton extrahiert. Zum Versuch wurden jeweils 0,5 g des extrahierten Blattpulvers mit 2 ccm destilliertem Wasser und 4 ccm wasserfreiem Aceton, das 4 mg Chlorophyll a + b enthielt, im Thermostaten bei 25° geschüttelt. Die Versuchsdauer betrug gewöhnlich 1 Stunde, nur bei *Avena* infolge geringen Chlorophyllasegehaltes 6 Stunden. Die Ergebnisse der Hydrolysebestimmung zeigt Tabelle 14.

Tabelle 14.

Blattmaterial	grün u	ausgebleicht u
<i>Tropaeolum maius</i>	12	10
<i>Sparmannia africana</i>	23	18
<i>Avena sativa</i>	10	7
<i>Aesculus hippocastanum</i>	14	12
<i>Acer campestre</i>	28	10

Demnach steht der Chlorophyllasegehalt in keiner besonders ausgesprochenen Beziehung zu einem künstlich erzielten, vitalen Chlorophyllabbau, vor allem ist keine, an sich zunächst denkbare, Steigerung des Enzymgehaltes zu verzeichnen.

¹ MOLISCH, H.: Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturwiss. Kl., Abt. 1, 127, 3 (1918).

b) Etiolierte Pflanzen.

Avena sativa und *Lupinus polyphyllus* wurden unter völligem Lichtabschluß, die Kontrollpflanzen im diffusen Tageslicht, aus Samen kultiviert, indem wiederum in beiden Fällen möglichst gleiche Bedingungen eingehalten wurden. Außerdem wurden dadurch mittlere Bedingungen zwischen den beiden Extremen geschaffen, daß ein Teil der im Dunkeln kultivierten Pflanzen täglich $\frac{1}{2}$ Stunde lang dem diffusen Tageslicht ausgesetzt wurde. Diese Behandlung stützt sich auf die Tatsache, daß die Blätter intermittierend belichteter Pflanzen eine bedeutend größere Ausbildung erreichen als die der dauernd verdunkelten, ohne jedoch sichtbar zu ergrünen (vgl. BATALIN¹ und TRUMPF²).

Nach einigen Wochen wurden die Blätter getrocknet, und zwar die der intermittierend belichteten und der Dunkelpflanzen unter Lichtabschluß. Die einzelnen Blattpulver wurden in derselben Weise wie bei a) mit verdünntem Aceton extrahiert und getrocknet.

Nach Überführung der Acetonextrakte in Äther ergab die spektroskopische Untersuchung für die dauernd verdunkelten Pflanzen völliges Fehlen von Chlorophyll, dagegen Vorhandensein von wenig Protochlorophyll. Im Extrakt der intermittierend belichteten Pflanzen konnte dagegen ziemlich viel Chlorophyll nachgewiesen werden, das jedoch mit bloßem Auge in den Blättern nicht wahrzunehmen war, also weit unter dem normalen Chlorophyllgehalt lag.

Zur u-Bestimmung wurden 0,5 g extrahiertes Blattpulver mit 2 ccm destilliertem Wasser und 4 ccm wasserfreiem Aceton, in dem 4 mg Chlorophyll a + b gelöst waren, versetzt und die Versuchsmischung von *Lupinus* jeweils 1 Stunde, die von *Avena* jeweils 6 Stunden bei 25° geschüttelt. Es ergaben sich folgende Umsatzwerte:

Tabelle 15.

Blattmaterial	normal	intermittierend belichtet	dauernd verdunkelt
	u	u	u
<i>Avena sativa</i>	9	8	4
<i>Lupinus polyphyllus</i>	28	24	19

Demnach besitzen die völlig im Dunkeln aufgezogenen, also chlorophyllfreien Pflanzen beträchtlich weniger Chlorophyllase als normale Lichtpflanzen. Sehr bemerkenswert ist die Tatsache, daß intermittierend belichtete Pflanzen trotz äußerst geringem Chlorophyllgehalt in ihrer enzymatischen Wirksamkeit mit den normal grünen Pflanzen annähernd übereinstimmen. Dies läßt einerseits die Folgerung zu, daß der ange-

¹ BATALIN, A.: Bot. Ztg 29, 669 (1871).

² TRUMPF, CHR.: Über den Einfluß intermittierender Belichtung auf das Etiolement. Diss. Hamburg 1922.

strebten Chlorophyllbildung die Entstehung der Chlorophyllase vorangeht, um sich wohl im Sinne der WILLSTÄTTERSchen¹ Annahme an der Chlorophyllsynthese zu beteiligen. Andererseits ist jedoch zu bedenken, daß intermittierende Belichtung im Gegensatz zur dauernden Verdunklung, wie oben erwähnt, kräftigere Ausbildung der gesamten Pflanze zur Folge hat, so daß der höhere Chlorophyllasegehalt bei intermittierend belichteten Pflanzen vielleicht nichts anderes als ein Symptom für einen im Vergleich zu dauernd verdunkelten Pflanzen weniger abnormen Entwicklungszustand bedeutet, wie dies umgekehrt auch unter den Verhältnissen des künstlichen Chlorophyllabbaus durch Verdunklung der Fall zu sein scheint (vgl. S. 326).

Zusammenfassung.

Die Arbeit bezweckte die enzymchemische und biologische Charakterisierung der Chlorophyllase auf der von WILLSTÄTTER festgestellten Grundlage.

1. Zur Ermittlung der noch unbekanntem p_H -Abhängigkeit der Chlorophyllasewirkung mußte das Enzym aus dem Blattgewebe isoliert werden, da das Blattmehl infolge seiner starken Adsorptionsfähigkeit zu Pufferversuchen nicht geeignet ist. Mit Hilfe eines Enzympräparates, das aus einer Suspension desorganisierter Chloroplastenmasse durch Fällung mit Aceton erhalten wurde, gelang es, für Chlorophyll a+b die zugehörige p_H -Kurve zu ermitteln. Das hierbei ermittelte Optimum der Chlorophyllasewirkung gilt auch für die getrennten Komponenten a und b des Chlorophylls; jedoch stimmt die p_H -Kurve für Chlorophyll a mit der für Chlorophyll b nicht überein, da die Komponente a eine größere Umsetzungsgeschwindigkeit aufweist als b.

2. Chlorophyll und Phäophytin verhalten sich gegenüber der Chlorophyllase gleich, und zwar reagiert die Komponente a in beiden Fällen rascher als die Komponente b. Die allomeren Formen zeigen eine bedeutend geringere Umsetzungsgeschwindigkeit, wobei wiederum die a-Komponenten rascher hydrolysiert werden als die b-Komponenten. Das Verhältnis der hydrolytischen Umsatzgeschwindigkeit zwischen den a- und b-Modifikationen, als „Hydrolytischer Quotient“ ($HQ_{\frac{a}{b}}$) bezeichnet, ist bei allen untersuchten Farbstoffen konstant und hat ungefähr den Wert 1,8.

3. Untersuchungen über die Lebensdauer der Chlorophyllase ergaben bei Verwendung von Reibgemischen des grünen Blattmehls mit Wasser im Verlauf von 72 Stunden eine Abnahme der enzymatischen Wirksamkeit. Die Umsetzungsgeschwindigkeit des blatteigenen Chlorophylls ist dabei sehr gering.

¹ WILLSTÄTTER, R. u. STOLL, A.: Ann. d. Chem. 378, 24 (1910).

4. Der Befund WILLSTÄTTERS, wonach von Elektrolyten durch Auswaschen befreite Enzympräparate inaktiviert und durch Zusatz von Calciumchlorid reaktiviert werden, wurde unter Anwendung zahlreicher anderer Elektrolyte weiter verfolgt. Reaktivierung konnte unter anderem erzielt werden mit 0,1 mol. Lösungen von Chloriden der Alkalien und Erdalkalien, ferner durch Kaliumpermanganat, Zinksulfat und Eisen(II)-salze, während Kupfersulfat die Enzymwirkung beeinträchtigt. Eisen(II)salz hat noch in Mengen von 0,001 mol. steigernde Wirkung.

Elektrolytzusatz zu nicht ausgewaschenen Enzympräparaten hatte keine Steigerung der Enzymwirksamkeit über die Norm zur Folge.

5. 0,1 mol. Kaliumcyanid hemmt die Enzymwirksamkeit im ausgewaschenen Blattpulver völlig, während im normalen, elektrolythaltigen Enzympräparat jegliche Hemmung ausbleibt.

6. Bei zweistündiger Einwirkung von Salzsäure- und Ammoniaklösungen auf das vom Chlorophyll befreite Blattmehl erweist sich das Enzym gegenüber Salzsäure ziemlich resistent, während Ammoniak eine erheblich größere Schädigung zur Folge hat.

7. Bei Erwärmung frischer, chlorophyllasehaltiger Blätter wird das Enzym durch 10 Minuten lange Temperatureinwirkung von 60° und mehr erheblich geschädigt.

8. In Übereinstimmung mit WILLSTÄTTER wurde das Vorhandensein von Chlorophyllase in sämtlichen untersuchten Pflanzenarten festgestellt, wobei sich in den ermittelten Umsatzwerten sehr große Verschiedenheiten ergaben. Diese sind weder vom Elektrolytgehalt noch, mit Ausnahme sehr säurereicher Pflanzen, von den p_{H} -Bedingungen abhängig.

9. Der Chlorophyllasegehalt ausgewachsener grüner Blätter ist zu verschiedenen Jahreszeiten gewissen Schwankungen unterworfen, indem er im Mai einen höheren Stand aufweist als im Juli und hierauf wieder zunimmt, so daß im September oft dieselbe Enzymmenge vorhanden ist wie im Mai, während sich im November von neuem ein Rückgang bemerkbar macht.

10. Der Gehalt an Chlorophyllase ist außerdem vom Alter der Blätter bestimmt. Während derselben Jahreszeit enthalten ganz junge Blätter bedeutend weniger Chlorophyllase als ältere Blätter, während im Stadium der herbstlichen Verfärbung mit dem Verschwinden des Chlorophylls auch eine Abnahme der enzymatischen Wirksamkeit verbunden ist.

11. Die weißen und grünen Teile panaschierter Blätter zeigen ebenfalls Verschiedenheiten des Enzymgehalts, die jedoch im Vergleich zu den sehr stark differierenden Chlorophyllmengen nicht sehr beträchtlich sind. Chlorophyllase fand sich bei *Heracleum* und *Lamium* auch in der Wurzel.

12. Dunkelbehandlung grüner Pflanzen, die in den meisten Fällen eine Ausbleichung des Chlorophylls zur Folge hatte, verursachte stets eine geringe Abnahme der enzymatischen Wirksamkeit. Außerdem enthalten völlig im Dunkeln kultivierte Pflanzen beträchtlich weniger Chlorophyllase als normale Lichtpflanzen, während intermittierend belichtete Pflanzen, die bei Ausbildung verhältnismäßig großer Blätter nur äußerst wenig Chlorophyll führen, annähernd gleichen Chlorophyllasegehalt aufweisen wie die normal grünen Pflanzen.

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1928 und 1929 im Botanischen Institut der Universität Erlangen mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft ausgeführt, die dem Institut die Mittel zur Verfügung stellte.

Es sei mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. KURT NOACK, für die Anregung zu dieser Arbeit und die stete Unterstützung bei ihrer Ausführung meinen ergebensten Dank auszusprechen. Ferner bin ich Herrn Dr. W. KIESSLING für seine vielfachen Ratschläge zu großem Dank verpflichtet.
