

gang vom definierten Molekülgitter zum Gitter der Hochmolekularen vermittelt.

Unsere technischen Assistentinnen, Frln. Eva Schmaida und Frln. Ursula Kämpf, danken wir herzlich für ihre fleißige Hilfe bei der Ausführung der Röntgenaufnahmen.

## 56. Kurt Heß und Christa Heß: Über eine colorimetrische Bestimmungsmethode für Tyrosinase und ihre Anwendung bei kautschukführenden Löwenzahnrasen.

[Aus Rubi, Post Langenwang i. Allgäu, eingegangen am 14. April 1947.]

Es wurde gefunden, daß die kautschukführenden Wurzeln von *Taraxacum Kok-saghyz* Rod. tyrosinasefrei sind, während der mit *Kok-saghyz* nahe verwandte kautschukfreie Löwenzahn (*Taraxacum officinale*) Tyrosinase enthält. Um festzustellen, welche Beziehung zwischen Kautschuk und Tyrosinase besteht, wurden Hybriden aus beiden Rassen herangezogen, für deren Untersuchung ein colorimetrisches Verfahren angegeben wird, das auch sehr geringe Gehalte von Tyrosinase mit genügender Genauigkeit zu ermitteln gestattet.

Das Verfahren beruht auf einer kurzzeitigen Verfolgung der Bildung des roten Farbstoffs aus Tyrosin durch Messung der Lichtabsorption mit dem Photozellencolorimeter nach R. Havemann, während der die in Skalenteilen des Geräts über der Zeit aufgetragenen Reaktionskurven einen geradlinigen Verlauf zeigen. Der Neigungswinkel der Geraden gegen die Abszisse bzw. seine Tangente ist in einem genügend großen Meßbereich der Fermentkonzentration annähernd proportional und kann als relatives Maß für die Aktivität der Fermentpräparate gelten. Eine durch Titration der Reaktionslösungen ermittelte Bezugskurve zwischen dem tg-Wert und dem Tyrosinase-Umsatz nach 2 Stunden führt zu der scheinbaren Wirkungseinheit des Ferments, als die der Umsatz von 1 mg Tyrosin gewählt wird, woraus sich als absoluter Tyrosinasewirkungswert die Zahl der Wirkungseinheiten/1 g Wurzelrockensubstanz ergibt.

Aus dem Vergleich der Tyrosinasewirkungswerte mit den Kautschukgehalten der Hybriden ergibt sich, daß eine Beziehung zwischen Tyrosinasegehalt und Kautschukgehalt in den Wurzeln nicht besteht. Dadurch ist die Annahme nahegelegt, daß Kautschuk-An- und Abwesenheit sowie Tyrosinase-An- und Abwesenheit für die beiden Stammarten je ein gegensätzliches Merkmalspaar darstellen, die — jeweils das eine unabhängig vom anderen — zur Bildung von dihybriden Kreuzungen führen.

### Das Kautschuk-Vorkommen in *Taraxacum Kok-saghyz* Rod.

*Taraxacum Kok-saghyz* ist ein ursprünglich als Gebirgspflanze (Turkestan, Ausläufer des Tjan-schanj-Gebirges) vorkommender, von dem russischen Botaniker Rodin 1931 aufgefundener Kautschukträger<sup>1)</sup>, der der reichgegliederten in Europa einheimischen Gattung *Taraxacum* (Löwenzahn), die kautschukfrei ist, nahesteht und zu ihr gezählt wird. Die Pflanze ist erfolgreich in der gemäßigten Zone kultiviert worden. Der Kautschuk kommt in der Wurzel (Pfahlwurzel) in Milchröhren vor, die ähnlich denen des Löwenzahns konzentrisch um den zentralen Gefäßkörper der Wurzel angeordnet sind und aus denen er beim Anschneiden als weiße Milch ausfließt. Nach den Ergebnissen des Ozonabbaus, dem Vergleich der Röntgenbilder<sup>2)</sup>, dem Vergleich der Viscositätskennzahlen [7]

<sup>1)</sup> S. Iwanow, Einiges über das Studium der kautschukhaltigen Pflanzen und des Kautschuks der U.d.S.S.R., Kautschuk 1930, S. 237, 256 (Moskau); A. A. Nitschporowitsch, Physiology and Anatomy of plants (Collected volume), Moskau 1936; A. A. Prokofjew, in B. A. Keller, Der Kautschuk und die Kautschukträger, Moskau 1938.

<sup>2)</sup> Unveröffentlichte Versuche von H. Kiessig.

und der Aufnahme von Fließkurven<sup>3)</sup> der Lösungen des koagulierten Fließes sowie den Ergebnissen der technologischen Prüfung<sup>4)</sup> gehört der Kok-saghyz-Kautschuk durchaus in die Gruppe der bekannten Kautschuk-Kohlenwasserstoffe, doch fehlt ihm die Gelkomponente (ätherunlöslicher Anteil<sup>5)</sup>) und seine Alterungseigenschaften liegen etwas ungünstiger<sup>6)</sup> als die von Hevea-Kautschuk.

### Kautschuk- und Tyrosinasegehalt.

Die nahe Artverwandtschaft der kautschukhaltigen und kautschukfreien Taraxacumrassen bietet eine einzigartige Gelegenheit für den Versuch, im Zusammenhang mit anderen chemischen Unterscheidungsmerkmalen der Frage nach den für die Kautschukbildung maßgebenden Faktoren durch quantitative Bestimmung dieser Merkmale in Mischrassen näherzukommen. Wir haben zunächst gefunden, daß Kautschuk speichernde Wurzeln von mit Löwenzahn unvermischem Kok-saghyz keine Tyrosinase enthalten, während im kautschukfreien Löwenzahn (*Taraxacum officinale*) diese Oxydase ebenso wie in anderen Kompositen und Kohlenhydrate speichernden Knollengewächsen in verhältnismäßig großen Mengen vorkommt.

Um zu prüfen, ob zwischen dem Gehalt an Kautschuk und Tyrosinase eine nähere Beziehung besteht, wurden Bastarde zwischen beiden Rassen herangezogen und eine für Reihenversuche geeignete Methode der Tyrosinasebestimmung ausgearbeitet, die es gestattet, den Oxydasegehalt auch bei geringen Fermentkonzentrationen mit genügender Genauigkeit quantitativ zu ermitteln. Der Kautschukgehalt wurde nach Entfernung der Harzbestandteile (mit Aceton) durch Extraktion mit Chloroform bestimmt.

### Aktivitätsbestimmung von Tyrosinase durch Farbmessung bei geringem Fermentgehalt<sup>7)</sup>.

Die bekannten Methoden für die Tyrosinase-Bestimmung wie die durch Titration des entstandenen Melanins nach A. Bach<sup>8)</sup>, durch jodometrische Bestimmung des unverbrauchten Tyrosins nach H. S. Raper und A. Wormall<sup>9)</sup> u. a., durch Bestimmung des aus Tyrosin hervorgehenden 3.4-Dioxy-phenylalanins nach L. Pincusse und T. Hammerich<sup>10)</sup> oder schließlich nach M. Graubard und J. M. Nelson<sup>11)</sup> durch manometrische Bestimmung des bei der Tyrosinreaktion verbrauchten Sauerstoffs erwiesen sich infolge Ungenauigkeit<sup>8)</sup>, Umständlichkeit<sup>9,10)</sup> oder der Notwendigkeit zu großer Substanzmengen für den vorliegenden Zweck als ungeeignet.

<sup>3)</sup> Unveröffentlichte Versuche von W. Philippoff; vergl. dazu W. Philippoff, Kautschuk 15, 191 [1939].

<sup>4)</sup> Untersuchung von Hrn. Dr. Kluckow im Materialprüfungsamt in Berlin-Dahlem.

<sup>5)</sup> R. Pummerer und H. Pahl, B. 60, 2152 [1927]. Von den Kautschuk-Kohlenwasserstoffen im frischen Latex von Kok-saghyz sind nach unveröffentlichten Versuchen von Frau Dipl.-Chem. R. Caesar 98.9% in Benzol, 98.7% in Äther und 97.4% in Petroläther löslich; ähnliche Löslichkeitsverhältnisse haben wir auch nach der Koagulation bei den frisch hergestellten Kautschukfließern beobachtet (unveröffentlichte Versuche von W. Wachs).

<sup>6)</sup> Vermutlich infolge des relativ hohen Mangangehalts, der bei der Aufbereitung aus dem kautschukfreien Wurzelgewebe in den Kautschuk wandert. Während in Hevea-Kautschuk nur etwa 0.2 mg% Mangan enthalten ist, haben wir bei Kok-saghyz-Kautschuk bis zu 1—3 mg% gefunden. Die Wurzeln enthalten etwa 5.0—5.2% Asche, die 0.09% Manganoxyd enthält. Im Latex haben wir kein Mangan gefunden (unveröffentlichte Versuche von E. Steurer und Frl. H. Meißner sowie von Frau R. Caesar).

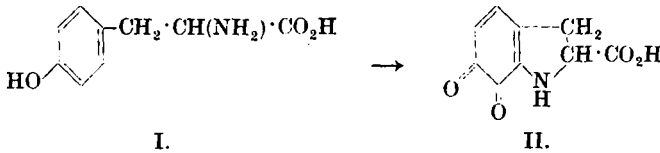
<sup>7)</sup> Auszug aus der Diplomarbeit Christa Heß, Tübingen 1947. <sup>8)</sup> B. 41, 221 [1908].

<sup>9)</sup> Biochem. Journ. 17, 454 [1923].

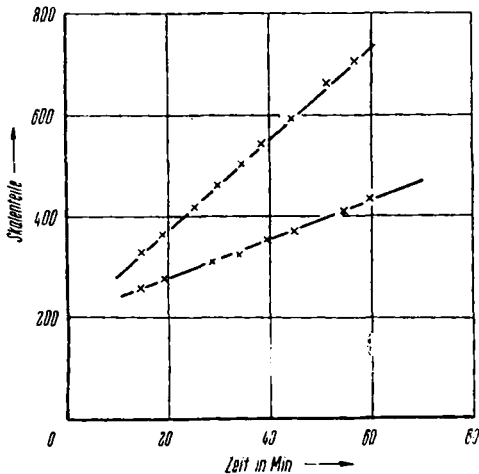
<sup>10)</sup> Biochem. Ztschr. 239, 273 [1931].

<sup>11)</sup> Journ. Biol. Chem. 112, 135 [1935].

Wir haben ein colorimetrisches Verfahren entwickelt, das auf der Bildung des roten chinoiden Farbkörpers II aus Tyrosin (I), dessen Auftreten s. Zt. zur Entdeckung der Tyrosinase geführt hatte, beruht:



Schon Pincussen und Hammerich hatten sich für grobe Schätzungen bei Bestrahlungsversuchen an Tyrosinase im UV dieser Möglichkeit bedient und ebenso R. Weidenhagen<sup>12)</sup> bei Versuchen für Vergleichsmessungen über eine Anreicherung des Ferments. Die Zeit, die Tyrosinasepräparate unter vergleichbaren Bedingungen benötigen, um einen bestimmten Farbton zu erzeugen, bezeichnet Weidenhagen als Färbungszeit und findet sie annähernd umgekehrt proportional der vorhandenen Tyrosinasemenge.



Abbild. 1. Anfänglicher Kurvenverlauf für die zeitliche Abhängigkeit der abgelesenen Skalenteile auf der Trommel des Colorimeters bei der Messung der Farbstoffbildung aus Tyrosin.

Das im folgenden verwendete Verfahren ist ein Nährungsverfahren und beruht auf einer verhältnismäßig kurzzeitigen Verfolgung der Bildung des roten Farbstoffs aus Tyrosin bei der Lichtabsorption mit dem Photozellencolorimeter nach R. Havemann<sup>13)</sup>, während der die in Skalenteilen (Skt) des Geräts über der Zeit aufgetragenen Reaktionskurven einen geradlinigen Verlauf zeigen, und die Bildung von Melanin noch nicht ins Gewicht fällt (Abbild. 1). Durch Verdünnungsreihen des Ferments (vergl. Tafel 1) ergab sich in einem im Rahmen der vorliegenden Untersuchung ausreichenden Meßbereich annähernde Proportionalität der Neigungswinkel der Geraden gegen die Abszisse mit

der Fermentkonzentration, so daß dieser Winkel bzw. seine Tangente  $\text{tg } \alpha = \Delta_{\text{Skt}} / \Delta_t$  als ein relatives Maß für die Aktivität der Fermentpräparate in erster Näherung gelten kann.

In der Abbild. 2 sind (durch  $\times$  gekennzeichnet) die  $\text{tg}$ -Werte der Tafel 1 als Ordinate über die Verdünnungsgrade als Abszisse für einen tyrosinreichen Kartoffelpreßsaft (Ausgangssaft = 100) aufgetragen, woraus hervorgeht, daß bei dem verwendeten Kartoffelsaft die angegebene Proportionalität bis zu Verdünnungsgraden unterhalb etwa 15% besteht. Oberhalb dieser Grenze

<sup>12)</sup> R. Weidenhagen und F. Heinrich, Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. 1928, 512.

<sup>13)</sup> Biochem. Ztschr. 301, 105 [1939]; 306, 224 [1940].

verlangsamt sich die Zunahme des tg-Wertes mit zunehmender Fermentkonzentration erheblicher.

Tafel 1. Abhängigkeit der tg-Werte von der Verdünnung (Kartoffel-  
ausgangssaft = 100).

Verdünnung in % Kartoffel- ausgangssaft .....	25	20	14.29	10	6.67	4
tg $\alpha$ .....	14.1	12.8	10.02	7.58	4.7	3.35

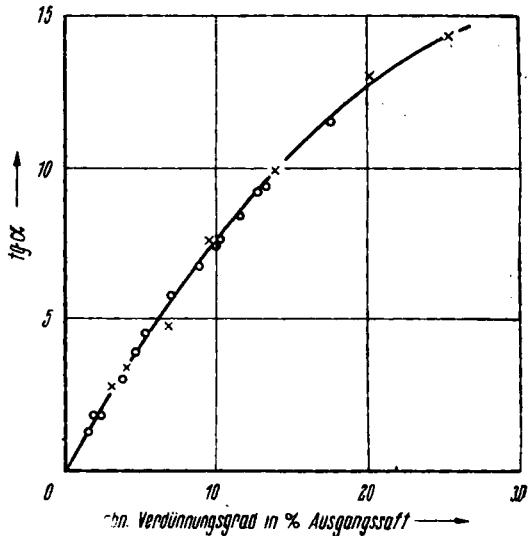
Tafel 2. Abgelesene Skalenteile vor und nach Verdünnung einer  
Meßlösung zur Prüfung des Beerschen Gesetzes.

	Reaktionsdauer in Min.	Skalenteile	Auf Grund des Beerschen Gesetzes ber. Skalenteile
Ausgangslösung 1 ....	14.0	750	—
„ 2 ....	6.0	1063	—
Verd. Lösung 1 ....	14.5	470	375
„ 2 ....	6.5	678	531

Die Ursache der Abweichung hängt wahrscheinlich mit einer gewissen Abweichung der Farblösungen vom Beerschen Gesetz zusammen, die in der gleichen Richtung liegt, wie die in Frage stehende Abweichung von der Proportionalität zwischen tg-Wert und Fermentkonzentration.

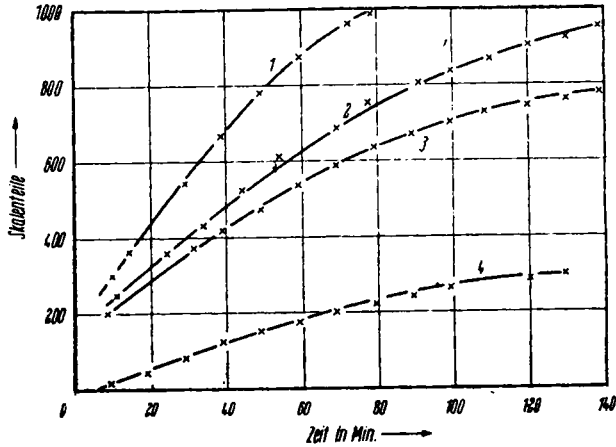
Zur Prüfung wurde die Reaktionslösung bei Erreichung eines bestimmten Absorptionswertes auf das doppelte Volumen verdünnt; die verdünnte Lösung zeigte entsprechend Tafel 2 einen höheren Absorptionswert als unter vergleichbaren Bedingungen dem Beerschen Gesetz entspricht in Übereinstimmung mit der Feststellung in Abbild. 2, nach der unterhalb 15% der Konzentration des Ausgangssafts tg  $\alpha$  als Maß der Farbstoffkonzentration stärker zunimmt als oberhalb 15%.

Im übrigen hält sich die Abweichung in den für die Bestimmungen bei Löwenzahn und den Hybriden mit Kok-saghyz in Betracht kommenden Fermentkonzentrationen in durchaus erträglichen Grenzen. Dies ergibt sich durch Vergleich der Kurve in Abbild. 2 mit weiteren Verdünnungsreihen von Preßsäften mit verschiedener Fermentkonzentration, z.B. durch Zuordnung des ermittelten tg-Wertes des niedrigsten Verdünnungsgrades einer zweiten Reihe zu der Konzentration des der Kurve in Abbild. 2 zugrundeliegenden Preßsafts als Bezugskonzentration, Ermittlung des Umrechnungsfak-



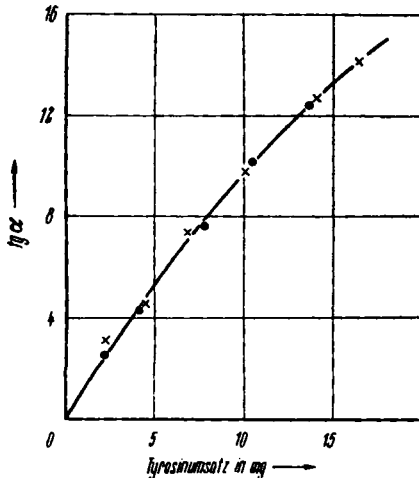
Abbild. 2. tg  $\alpha$  als Maß für die Farbstoffzunahme in Abhängigkeit von der Fermentkonzentration (Ausgangssaft = 100); x entsprechen den tg-Werten der Tafel 1; o interpolierte Werte entsprechend den Ausführungen auf S. 344.

tors für die verglichene Konzentration und Ablesung des tg-Wertes zu der nächst niederen Konzentration der zweiten Verdünnungsreihe auf Grund des Umrechnungsfaktors.



Abbild. 3. Kurvenverlauf für die zeitliche Abhängigkeit der abgelesenen Skalenteile Tyrosinumsatz auf der Trommel des Colorimeters bei längerer Reaktionsdauer.

Durch Untersuchung von 14 verschiedenen Preßsäften wurde festgestellt, daß die durchschnittliche Abweichung der interpolierten tg-Werte (auf der Kurve der Abbild. 2 durch o gekennzeichnet) von den gemessenen Werten dieser Reihen nur innerhalb von  $\pm 6\%$  abweichen.



Abbild. 4 tg  $\alpha$  und Tyrosinumsatz (Tyrosinaseverbrauch) nach 120 Minuten; x beobachtete tg-Werte, • titrimetrisch ermittelter Tyrosinumsatz in mg.

Um mit Hilfe des tg-Wertes als relativem Maß für die Aktivität der Fermentpräparate, das nur im Rahmen der verwendeten Meßmethode gilt, eine von dem verwendeten Gerät unabhängige Wirkungseinheit zu gewinnen, wurde der tg-Wert mit dem Tyrosinumsatz dadurch in Zusammenhang gebracht, daß dieser für eine Reihe von tg-Werten nach einer längeren Reaktionszeit (120 Min.) bestimmt wurde (vergl. Abbild. 3), während welcher er so groß geworden ist, daß er durch Titration bequem ermittelt werden kann. Auf diese Weise wurde eine Bezugskurve (Abbild. 4) aufgestellt, aus der zu jedem in Frage kommenden tg-Wert der Tyrosinaseverbrauch nach 120 Min. entnommen werden

kann. Die Tyrosin-Bestimmung erfolgte dabei in Anlehnung an die maßana-

lytische Bestimmung nach H. Haehn und J. Stern<sup>14</sup>) mit der Abänderung, daß ebenso wie bei der colorimetrischen Bestimmung nicht Luft-sauerstoff, sondern Wasserstoffperoxyd als Oxydationsmittel verwendet wurde, was keine grundsätzliche Änderung bedeutet, da das Peroxyd durch die anwesende Katalase sehr schnell zersetzt wird und der entstehende Sauerstoff wie Luftsauerstoff wirkt.

Als scheinbare Wirkungseinheit des Ferments wurde der nach 2-stdg. Einwirkung einer 0.1-proz. Wasserstoffperoxyd-Lösung bei 20° und p<sub>H</sub> 6.81 erfolgte Umsatz von 1 mg Tyrosin gewählt, so daß sich als absoluter Tyrosinase-Wirkungswert für die Enzymaktivität eines Wurzelpräparats die Zahl der Wirkungseinheiten je 1 g Wurzeltrockensubstanz ergibt.

### Die quantitativen Ergebnisse.

In der Tafel 3 sind die Bestimmungsergebnisse für Tyrosinase, Kautschuk und Harz in Wurzeln von 19 willkürlich herausgegriffenen einjährigen unvermischten Kok-saghyz-Pflanzen zusammengestellt. Diese Wurzeln enthalten ausnahmslos keine Tyrosinase. Der Kautschuk-Gehalt zeigt eine Variationsbreite von 1.3—15.2% und beträgt im Durchschnitt 5.4% je Wurzeltrockengewicht. Diese Werte haben sich bei Massenanalysen<sup>15</sup>) (Größenordnung 10000) mit nur unbedeutenden Abweichungen bestätigt. Der Harzgehalt<sup>16</sup>) liegt bei einer Variationsbreite von 4.7—15.8% im Durchschnitt bei 9.2% (9.1% im Durchschnitt bei dem untersuchten Löwenzahn).

Entgegen der hin und wieder in russischen Arbeiten auftretenden Angabe<sup>17</sup>), daß Kautschuk- und Harzgehalt in einem annähernd reciproken Mengenverhältnis vorkommen, sei darauf hingewiesen, daß sich dies nur auf Einzelfälle, wie z.B. Nr. 7 und 10 in der Tafel 3 beschränkt, während mindestens ebenso häufig Fälle vorkommen, die bei wenig Kautschuk auch wenig Harz (Nr. 8 und 14) und bei viel Kautschuk viel Harz (Nr. 3 und 13) aufweisen.

In der Tafel 4 (S. 347) sind die Analysenergebnisse für 48 Bastardexemplare (ebenfalls einjährig) wiedergegeben. Der durchschnittliche Kautschukgehalt liegt bei einer Variationsbreite von 0.6—10.4% je Wurzel mit durchschnittlich 4.6% nur etwa 16% niedriger als bei unvermischem Kok-saghyz. Der Harzgehalt hält sich mit durchschnittlich 8.4% (Variationsbreite 1.1—18.9%) nahezu auf der Höhe der Stammarten. Im Vergleich mit unvermischem Löwenzahn, dessen Tyrosinase-Wirkungswerte bei 14.0—23.2 (mittl. Wert bei etwa 18.6) liegen, sind diese Werte bei den Hybriden auffallend niedrig; sie schwanken zwischen 11.0 und 0 (mittl. Wert bei etwa 3.5).

Auf Grund der Verteilung der Tyrosinase und des Kautschuks in den Stammrassen könnte man einen Zusammenhang von Kautschukbildung und

<sup>14</sup>) Biochem. Ztschr. 184, 182 [1927].

<sup>15</sup>) Unveröffentlichte Versuche von E. Steurer.

<sup>16</sup>) Eine eingehendere Untersuchung des Harzes behandelt die Diplomarbeit von M. Winiker „Versuche zur Feststellung der Inhaltsstoffe von Kok-saghyz-Wurzeln“, Berlin 1944.

<sup>17</sup>) Vergl. z.B. A. A. Prokofjew, Bull. Akad. Wissensch. der USSR, Abteil. Biologie [1939].

Tafel 3. Kautschukgehalt\*), Harzgehalt und Tyrosinase-Wirkungswert in *Taraxacum Kok-saghyz* (wahrscheinlich reinrassig\*\*).

Nr.	tg	absol. Tyrosinase-Wirkungswert	Harz in %	Kautschuk in %
1	0	0	7.8	2.7
2	0	0	4.7	5.5
3	0	0	13.5	10.1
4	0	0	10.0	1.3
5	0	0	15.2	5.2
6	0	0	13.7	2.0
7	0	0	5.8	11.5
8	0	0	6.1	1.5
9	0	0	15.8	3.9
10	0	0	11.7	1.9
11	0	0	6.9	6.3
12	0	0	8.8	1.4
13	0	0	12.3	15.2
14	0	0	5.7	2.1
15	0	0	—	8.8
16	0	0	—	6.5
17	0	0	—	5.0
18	0	0	—	5.8
19	0	0	—	7.4

\*) Alle Angaben auf absol. trockene Wurzeln bezogen.

\*\*) Wir verdanken das Material Hrn. Dr. R. W. Böhm vom Kaiser-Wilhelm-Institut für Züchtungsforschung, Abteil. für Kautschukpflanzen-Forschung, sowie Hrn. Dipl.-Landw. Dr. Caesar.

Tyrosinasegehalt in dem Sinne erwarten, daß der Kautschukgehalt und der Tyrosinasewirkungswert in den Hybriden in einem reciproken Verhältnis auftreten. Wie aber aus der Tafel 4 hervorgeht, ist dies in keiner Weise der Fall, indem z.B. Hybriden auftreten, die neben einem höheren Tyrosinase-Wirkungswert einen verhältnismäßig hohen Kautschukgehalt (Nr. 1, Tafel 4) aufweisen, sowie Hybriden, denen neben einem geringen oder verschwindend geringen Tyrosinase-Wirkungswert sowohl ein hoher als auch ein niedriger Kautschukgehalt zugeordnet ist (Nr. 27 bzw. Nr. 29, Tafel 4). Man gewinnt also den Eindruck, daß die beiden Eigenschaften nicht gekoppelt sind, sondern unabhängig voneinander auftreten; die Kautschukbildung wird von der Gegenwart der Tyrosinase entweder gar nicht oder nur in einem untergeordneten, jedenfalls bisher nicht erkennbaren Maße beeinflusst.

Genetische Betrachtung: Sucht man nach einer Erklärung für die scheinbar gesetzlos schwankenden Werte für Kautschuk- und Tyrosinasegehalt in den Hybriden, so könnte ein Zusammenhang in genetischer Richtung etwa in dem Sinne bestehen, daß eine Kautschukanwesenheit und -abwesenheit sowie Tyrosinasean- und -abwesenheit je ein gegensätzliches Merkmalspaar darstellen, die — jeweils das eine unabhängig vom anderen — zur Bildung von zweipaarigen (dihybriden) Kreuzungen führen. Die Feststellung, daß der beobachtete Kautschukgehalt in der überwiegenden Mehrzahl der untersuchten Hybriden auf ähnlicher Höhe wie bei unvermishtem *Kok-saghyz* liegt, macht es unter Berücksichtigung des dritten Mendelschen Gesetzes über die freie

Tafel 4. Kautschukgehalt, Harzgehalt und Tyrosinase-Wirkungswert in Bastarden zwischen *Taraxacum Kok-saghyz* und *Taraxacum officinale*\*).

Nr.	tg $\alpha$ **)	absol. Tyrosinase-Wirkungswert	Harz in %	Kautschuk in %
1	12.0	11.12	8.6	8.3
2	9.8	8.84	7.3	5.1
3	9.8	8.84	5.4	5.9
4	9.4	8.0	9.0	3.1
5	8.2	7.40	10.0	7.5
6	8.4	7.40	12.2	1.5
7	7.4	6.56	11.3	5.2
8	6.8	6.0	1.1	2.3
9	6.6	5.68	5.1	5.4
10	6.8	5.68	15.4	6.8
11	6.2	5.40	5.3	5.3
12	6.0	5.12	6.9	0.6
13	5.8	5.12	18.9	9.0
14	5.6	5.12	4.7	3.3
15	5.8	5.12	12.3	3.4
16	6.0	5.12	6.0	2.3
17	5.8	5.40	4.9	1.2
18	5.4	4.56	6.5	9.5
19	5.4	4.56	14.4	2.4
20	4.6	4.0	10.5	3.8
21	4.8	4.0	8.7	9.4
22	4.8	4.0	5.4	1.7
23	4.4	3.68	7.9	3.0
24	4.0	3.40	3.8	3.4
25	4.2	3.40	10.9	0.7
26	4.2	3.40	4.5	2.8
27	3.4	2.84	10.7	7.4
28	2.8	2.28	5.7	2.5
29	2.8	2.28	12.3	0.8
30	2.0	1.68	8.2	2.0
31	2.12	1.68	5.6	0.46
32	1.8	1.60	5.2	2.8
33	1.68	1.40	5.6	1.7
34	1.7	1.40	9.0	6.7
35	1.6	1.12	7.2	7.9
36	1.4***)	1.12	10.3	5.7
37	1.4	1.12	18.3	10.0
38	1.28	1.12	9.8	5.5
39	0.96	0.84	6.6	2.7
40	1.12	0.84	12.3	9.6
41	1.2	0.84	5.3	2.6
42	0.6	0.56	2.8	2.6
43	0.8	0.56	9.1	7.0
44	0.48	0.56	14.6	4.3
45	0	0	8.3	5.7
46	0	0	6.1	8.5
47	0	0	5.7	4.7
48	0	0	6.5	5.0

\*) Das Material stammte teils von Anbaufeldern, wofür wir Hrn. Dipl.-Landw. Dr. H. Stahl zu Dank verbunden sind, teils von Versuchsfeldern unserer damaligen Institutsanlage in Löwenberg i. Schlesien.

\*\*) Aus Gründen des Meßbereichs auf der Ablesetrommel des Colorimeters war der tg-Wert in allen Fällen für 0.5 g Wurzelrockengewicht bestimmt worden; die obigen tg-Werte sind auf Grund der angegebenen Definition durch Verdoppelung der bestimmten Werte erhalten worden.

\*\*\*) Bei sehr kleinen Werten für tg $\alpha$  ist der Bestimmungsfehler größer wie oben angegeben.



Kombination der Gene verschiedener Erbanlagenpaare wahrscheinlich, daß für das Merkmalspaar Kautschukhaltigkeit (K) — Kautschukfreiheit (k) K dominant über k ist, Kautschukfreiheit also ein recessives Merkmal darstellt.

Andererseits scheinen auf Grund desselben Gesetzes die Tyrosinasmessungen für die Annahme zu sprechen, daß der Tyrosinasegehalt für den Erbgang intermediären Charakter hat, d. h., daß die Ausbildung des entsprechenden Merkmals in den Hybriden zwischen den beiden Merkmalen Tyrosinasehaltigkeit (Ty) und Tyrosinasefreiheit (ty) der Stammrassen steht. Hier wäre allerdings nach den Angaben in der Tafel 4 auch die Annahme einer Dominanz von ty diskutierbar. Die zur Klärung der genetischen Verhältnisse notwendigen Kreuzungs- und Rückkreuzungsversuche mußten bei der Aufgabe des Löwenberger Instituts abgebrochen werden.

Durch die Auffindung eines zweiten chemischen Paares gegensätzlicher Merkmale (Ty — ty) ist in der positiven Tyrosinase-Reaktion eine einfache und wie es scheint eine sichere chemische Diagnose zur Unterscheidung von stammreinen Kok-saghyz-Pflanzen von ihren Hybriden mit Löwenzahn gegeben, was um so erwünschter ist, als Taraxacumarten zur Parthenogenese neigen<sup>18)</sup>, so daß — abgesehen von morphologischen Merkmalen — gegebenenfalls erst durch die Tyrosinase-Reaktion im Zusammenhang mit dem Kautschukgehalt der Erfolg einer Bastardierung entschieden werden kann.

### Zur Kautschukbildung in der Pflanze.

O. Ambros<sup>19)</sup> hat durch die Beobachtung einer gegenüber Blindversuchen erhöhten Kautschukbildung im Milchsafte („Serum“) tropischer Kautschukträger auf Zusatz von Isopren-Emulsionen und sauerstoffgesättigtem Wasser wahrscheinlich gemacht, daß an der Polymerisation des Isoprens in der Pflanze Oxydasen beteiligt sind. A. Frey-Wyssling gibt an<sup>20)</sup>, daß sich unter den Oxydasen des Milchsafte von Euphorbiaceen und anderen tropischen Kautschukträgern auch Tyrosinase befindet. Trifft diese Angabe zu, deren Nachprüfung erwünscht ist, so fällt sie gegenüber der entgegenlaufenden Feststellung bei dem Kautschukträger Taraxacum Kok-saghyz auf, die zudem den einwandfreien Beweis dafür gibt, daß die Gegenwart von Tyrosinase für die Biosynthese von Kautschuk-Kohlenwasserstoffen nicht erforderlich ist<sup>21)</sup>. Wir haben im Milchsafte von Kok-saghyz und Löwenzahn Katalase festgestellt. Für die Beobachtung von Ambros kommen daher diese und andere Oxydasen in Frage.

Die Erscheinung, daß zwei so nahe verwandte Pflanzenrassen wie Kok-saghyz und Löwenzahn sich durch den Gehalt an Kautschuk unterscheiden, indem die eine bis zu hohen Beträgen, die andere überhaupt keine Kautschuk-

<sup>18)</sup> S. Murbeck, Parthenogenese bei den Gattungen Taraxacum und Hieracium, Bot. Notiser. (Schweden 1904). S. 285; H. Winkler, Verbreitung und Ursache der Parthenogenese im Pflanzen- und Tierreich (Jena 1920); O. Rosenberg, Apogamie und Parthenogenese bei Pflanzen im Handb. d. Vererbungswiss., Bd. 11 (Berlin 1930).

<sup>19)</sup> Revue générale du Caoutchouc, Paris 1937, S. 1022 (Congrès international du Caoutchouc).

<sup>20)</sup> Die Stoffausscheidung der höheren Pflanzen (Springer, Berlin 1935), S. 343.

<sup>21)</sup> Dabei bleibt die Möglichkeit, daß Unterschiede sekundärer Art zwischen Kok-saghyz-Kautschuk und Kolonial-Kautschuk, wie z. B. der Farbcharakter der aufgearbeiteten Fließe auf Unterschiede in der Zusammensetzung der Oxydase-Komplexe sowie auch der gegenwärtigen Phenol-Derivate zurückgehen.

Kohlenwasserstoffe<sup>22)</sup> erzeugen kann, scheint uns darauf hinzuweisen, daß Kautschukbildung nicht<sup>23)</sup> zum allgemeinen Assimilations-Dissimilations-Stoffwechsel der Pflanze gehört, wie z. B. die Bildung von Kohlenhydraten, Eiweiß, Fett-Wachs, Harzen, Chlorophyll, Carotinoiden u. a., die in allen autotrophen Pflanzen vorkommen, sondern daß die Bildung von Kautschuk-Kohlenwasserstoffen auf einen Spezialvorgang zurückgeht, ähnlich wie wir dies für zahlreiche andere Pflanzenprodukte annehmen müssen, von denen vor allem die Alkaloide und die nur gelegentlich auftretenden Farbstoffe und Farbstoffbildner wie Alizarin und Indoxyl genannt seien.

Aus der Untersuchung an den *Taraxacum*-Bastarden folgern wir, daß die Kautschukbildung offenbar von einem speziellen Erbfaktor abhängt, der die Veranlassung zu einer zusätzlichen physiologischen Leistung in der gleichen Weise gibt, wie es z. B. für das Auftreten eines Anthocyans in den Blättern der Blütenhülle einer buntrassigen Blütenpflanze gegenüber anthooyanfreien Abart seit Gregor Mendels klassischen Kreuzungsversuchen an Erbsen angenommen wird.

Nimmt man die bekannte Hypothese als gegeben an, nach der der formale Zusammenhang<sup>24)</sup> der Isopren-Konstitution mit den Konstitutionsbildern der allgemein vorkommenden Mono-, Sesqui-, Di- und Triterpene, Harzsäuren, Sterine, Saponine, Carotinoide u. a.

---

<sup>22)</sup> Ihre Abwesenheit ist erwiesen: 1.) durch den negativen Ausfall der Mikroreaktion an Wurzelquerschnitten mit Brom in Glycerin zum Kautschuk-tetrabromid gemäß der Vorschrift und mikroskopischen Beobachtung im Auflicht nach A. A. Prokofjew, dessen Unlöslichkeit in Tetrachlorkohlenstoff + Alkohol eine Unterscheidung von ungesätt. Harzanteilen ermöglicht (vergl. die ausführliche Darstellung des Autors im Sammelwerk von A. A. Nitschporowitsch „Die industriellen Kautschukträger der USSR“, 3. Kap., S. 114 usw.), 2.) durch Extraktionsversuche mit Chloroform und Aceton; hierbei empfiehlt es sich, zumal im Falle eines größeren Harzgehalts, nach dem Vorschlag von Ignatie w primär mit Chloroform (bei Raumtemperatur) zu extrahieren und den Rückstand zur Entfernung der Harze erschöpfend mit Aceton auszuziehen. Ausschließlich auf Grund eines Chloroformrückstands, der nach einer Vorextraktion der Pflanzenteile mit Aceton erhalten wird, auf die Anwesenheit von Kautschuk-Kohlenwasserstoffen zu schließen, ist unstatthaft, auch wenn dieser Rückstand, wie in älteren Arbeiten für verschiedene einheimische Kompositen und Euphorbia-Arten angegeben ist, in Form eines „Häutchens“ zurückbleibt.

Zur sicheren Entscheidung der Frage, ob in derartigen Rückständen tatsächlich Kautschuk-Kohlenwasserstoffe vorliegen, haben wir uns des röntgenographischen Dehnungseffekts (Auftreten der charakteristischen Kautschukinterferenzen beim Dehnen der Probe) bedient, d. h. den Rückstand schwach an vulkanisiert, auf Dehnbarkeit geprüft und gegebenenfalls im ungedehnten und gedehnten Zustand durchstrahlt. Bei Löwenzahn verblieb überhaupt kein vulkanisierbarer Rückstand.

<sup>23)</sup> Im russischen Schrifttum ist die Auffassung darüber geteilt; vergl. z. B. G. J. Borissow u. W. N. Lubimenko, Lokalisation und Physiologie der Kautschukbildung in den Pflanzen in B. A. Keller, Der Kautschuk und die Kautschukträger, Bd. I, S. 123 (Moskau 1938) u. A. A. Prokofjew, Bull. Akad. Wiss. d. USSR., Abteil. Biologie, 1939.

<sup>24)</sup> Vergl. u. a. besonders L. Ruzicka, Angew. Chem. 51, 6 [1938]; daß in diesem Sinne dem Isopren eine Schlüsselstellung für verschiedene beeinflussbare, biogenetische Reihen zufällt, kann durch die bemerkenswerte Beobachtung Prokofjews (Fußn.<sup>17)</sup>) begründet werden, daß sich in jungen Pflanzen der kautschukführenden Guajule das bis zu 70%  $\alpha$ -Pinen enthaltende äther. Öl schneller als der Kautschuk anhäuft, während Zellenalterung sowie ungenügende Wasserversorgung umgekehrt die Pinenbildung zugunsten der Kautschuk-Kohlenwasserstoffe zurücktreten läßt.

auf eine gemeinsame Bildung aus Isopren<sup>25</sup>) als intermediärem Stoffwechselprodukt zurückgeht, das selbst den ersten Assimilationsprodukten entstammt<sup>26</sup>), ist zu erwarten, daß der in Frage stehende Erbfaktor in der Umwandlungsfolge: Kohlenhydrat → Isopren (bzw. Protoisopren) → Terpen usw. am Isopren bzw. dem Protoisopren unter Mobilisierung entsprechender Katalysatoren eingreift und von diesem die Bildung von Kautschuk-Kohlenwasserstoffen als zusätzliche Reaktion abzweigt.

### Beschreibung der Versuche.

Das verwendete Colorimeter nach R. Havemann beruht auf der Kompensation zweier Photozellen, von denen die eine als Vergleichszelle dient, und eignet sich infolge seiner einfachen Handhabung zur Ausführung von Reihenversuchen besonders gut. Da das Gerät nach der Nullmethode arbeitet, die eine vollkommene Ausnutzung der Empfindlichkeit des zur Messung benutzten Galvanometers gestattet, besitzt es eine Empfindlichkeit, die selbst zur Erfassung sehr kleiner Tyrosinasmengen ausreicht. Außerdem steht durch die optische Kompensation der Meßzelle eine so große Ableseskala zur Verfügung, daß eine wesentlich größere Ablesegenauigkeit zu erreichen ist, als bei der kurzen Skala eines Zeigergalvanometers.

Die Lichtempfindlichkeit, bestimmt durch die 1% Lichtabsorption entsprechende Anzahl Skalenteile, beträgt im verwendeten Extinktionsbereich  $E = 0.7 - 0.13$  (entspr. 920—231 Skalenteile auf der Ablesetrommel) 10—5 Skalenteile, d. h. 1 Skalenteil entspricht einer Lichtempfindlichkeit von 0.1%—0.25% der gemessenen Lichtabsorption. Unter den gewählten Meßbedingungen ergibt sich eine Meßgenauigkeit von  $\pm 0.4\%$  bei  $E = 0.7$  und von  $\pm 0.9\%$  bei  $E = 0.13$ .

Fehlerquellen: Da bei dem Gerät eine sehr intensive Lichtquelle (100-Watt-Lampe) verwendet wird, ist auf möglichst kurze Belichtungsdauer zu achten, um die temperaturstrahlungs-empfindliche<sup>27</sup>) Fermentlösung vor Schädigung der Aktivität zu schützen. Die Belichtungsdauer betrug bei jeder Ablesung 10 Sekunden. Netzschwankungen führen selbstverständlich zu erheblichen Meßfehlern (gegebenenfalls Verwendung eines Regulierwiderstandes).

Vorbereitung des Fermentsafts: Die Wurzeln wurden möglichst unmittelbar nach der Ernte untersucht. Längere Transporte, zumal in der wärmeren Jahreszeit sind unbedingt zu vermeiden. Vor der Verarbeitung wurden die Wurzeln unter Wasser gründlich geschrubbt, mit Fließpapier abgetrocknet, mit einem Rasiermesser in etwa 1 mm dicke Scheiben geschnitten und gewogen. Zur Bestimmung des Wassergehalts wurde 1 g des geschnittenen Materials im Aufhäuser-Apparat nach der Xylolmethode analysiert und zur Gewinnung des Fermentsafts etwa 4—5 g mit dem gleichen Gewichtsteil Quarz und der dreifachen Menge Puffer-Lösung ( $p_H$  6.81) im Mörser zu einer cremeartigen Masse zerrieben. Durch Zentrifugieren während 15 Min. wurden Gewebereste und Stärkekörner abgetrennt. Die gelb-bräunliche Flüssigkeit muß unmittelbar gemessen werden, da nach mehrstg. Stehenlassen Trübungen auftreten, die einen Teil der Tyrosinase enthalten, der dann der Messung entgegen, wenn vor der Messung abzentrifugiert wird.

Die vergleichsweise herangezogenen Kartoffeln wurden vor der Untersuchung geschält, auf einer Reibe zerrieben und der Saft nach dem Einschlagen der Reibsel in ein Leinentuch mit der Hand ausgepreßt und zentrifugiert.

Die optimalen Reaktionsbedingungen: Diese entsprechen den Angaben von Haehn und Stern<sup>14</sup>) mit der Abänderung, daß Wasserstoffperoxyd statt Luft verwendet wird, deren Durchleitung sich bei der colorimetr. Messung verbietet. Als Reaktionstemperatur wurde 20° gewählt, bei der sich eine Zersetzung des Ferments während der Messung nicht bemerkbar macht. Zur Einstellung des  $p_H$  wurde eine Phosphatpuffer-Lösung nach Sörensen ( $n_{15}$  Kaliumbiphosphat,  $n_{15}$  Natriummonophosphat) verwendet. Wegen

<sup>25</sup>) Isopren ist bisher aus Pflanzen noch nicht isoliert worden. Es wird daher eine labile Vorstufe mit dem C-Gerüst des Isoprens diskutiert, die sich unmittelbar zu den verschiedenen Dissimilationsprodukten stabilisiert; vgl. dazu C. Harries, Untersuchung über die natürlichen und künstlichen Kautschukarten (J. Springer, Berlin 1919); F. G. Fischer, B. 64, 30 [1931] u. andere Autoren; von besonderer Bedeutung ist der von H. Popovici geführte Nachweis, daß Terpene im Zellplasma gebildet werden (Compt. rend. Acad. Sciences 188, 143 [1926]).

<sup>26</sup>) H. Fitting, Tropenpflanzer 10, Beih. 1 [1909]; F. P. Masanko, Physiologie und Biochemie der Kautschukträger, Moskau 1939; Kautschuk und Gummi (Moskau), Nr. 6 [1939].

<sup>27</sup>) L. Pineussen u. T. Hammerich, Biochem. Ztschr. 23, 273 [1931].

der Löslichkeitsverhältnisse des Tyrosins kann die Tyrosinkonzentration 0.03% nicht überschreiten; da sich 0.01% als zu gering erwies, wurde 0.02% gewählt.

Die Verwendung von Wasserstoffperoxyd ist in seiner Wirkung umstritten. Während A. Bach<sup>28)</sup> bei einer Konzentration von 0.01% und O. Führt<sup>29)</sup> für 0.05% eine reaktionsbeschleunigende Wirkung auf die Tyrosinase-Reaktion feststellen konnten, glaubte R. Chodat<sup>30)</sup>, daß bereits kleinste Mengen einen hemmenden Einfluß ausüben. Zur Prüfung des Widerspruchs wurden unter vergleichbaren Bedingungen (0.02% Tyrosin, 0.5% Kartoffelreißel (ber. Trockensbst.) die Reaktionsansätze mit 0.01, 0.1, 0.29 und 0.5% Wasserstoffperoxyd in der Gesamtlösung gemessen und gemäß Abbild. 5a und 5b festgestellt, daß nur die 0.5-proz. Wasserstoffperoxyd-Lösung die Tyrosinase-Reaktion verhindert, während bei den tieferen Peroxyd-Konzentrationen nur geringe bzw. keine Unterschiede in der Geschwindigkeit der Farbstoffbildung auftreten. Da nach Abbild. 5b 0.1-proz. Peroxyd besonders günstig wirkt, wurde diese Konzentration gewählt.

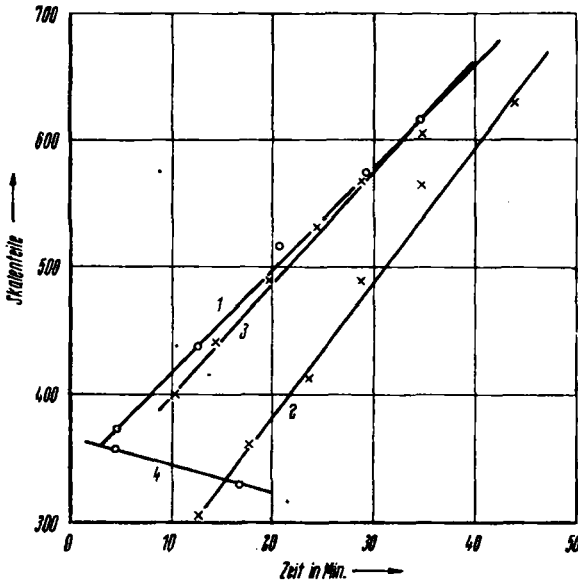


Abbildung 5a. Einfluß der Wasserstoffperoxyd-Konzentration auf die Farbstoffbildung (gemessen in Skalenteilen). Kurve 1: 0.01%, Kurve 2: 0.1%, Kurve 3: 0.29%, Kurve 4: 0.5% Wasserstoffperoxyd.

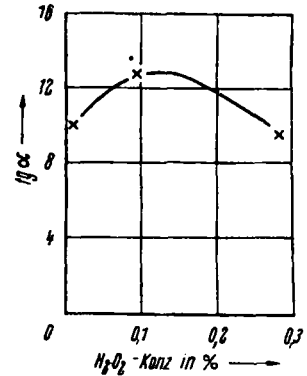


Abbildung 5b.  $\text{tg } \alpha$  in Abhängigkeit von der Wasserstoffperoxyd-Konzentration.

Von besonderem Einfluß auf die colorimetr. Werte erwies sich der bei den Messungen eingehaltene Verdünnungsgrad des Fermentsafts. Aus Abbild. 6 geht hervor, daß der  $\text{tg}$ -Wert nur bis zu einem bestimmten Verdünnungsgrad des Fermentsafts mit der Konzentration des Ferments zunimmt, d. h. daß oberhalb einer bestimmten Konzentration die Beziehung  $\text{tg } \alpha = \Delta \text{Sk}_t / \Delta t$  nicht mehr besteht. Bei den fermentärmeren Taraxacumrassen wurde diese Grenzkonzentration in keinem Fall erreicht. Bei dem tyrosinasereichen Preßsaft der Kartoffel dagegen muß für die angegebene Beziehung der Saft mit Pufferlösung auf mindestens 1:3 verdünnt werden.

Die Beobachtungsdauer der Farbbildung ist nach oben durch das Auftreten von Melanin beschränkt. Da zur Ermittlung der  $\text{tg}$ -Werte nur verhältnismäßig kleine Beobachtungszeiten notwendig sind, spielt die Melaninbildung keine Rolle. Im allgemeinen wurde während eines Zeitintervalls von 10–40 Min. nach Zusammengeben der Reaktionsteilnehmer beobachtet.

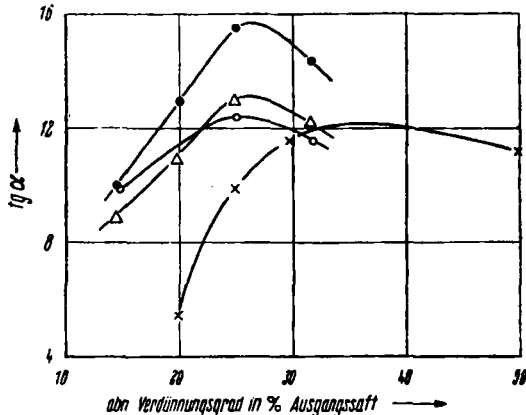
Durchführung einer colorimetr. Messung: Ausgangslösungen:  $m/15$  Phosphatpuffer (prim. Phosphat : sek. Phosphat = 1 : 1), 0.03-proz. Tyrosin-Puffer-Lösung, 0.1-proz. Wasserstoffperoxyd-Lösung, Enzymsaft.

<sup>28)</sup> B. 39, 2126 [1906].

<sup>29)</sup> Beitr. Chem. Physiol. Pathol. 10, 131 [1907].

<sup>30)</sup> Arch. Sci. physiques natur. Genève IV, Per. 24.

Reaktionsansatz: In einen 50-cm-Meßkolben werden 30 cm Tyrosin-Lösung, 5 cm Wasserstoffperoxyd-Lösung und die vorgeschriebene Menge Enzymsaft gegeben, die nach dem in einem Parallelversuch ermittelten Wassergehalt einem Trockengewicht von 0.5 g Wurzelmenge entspricht. Nach Auffüllen mit Puffer-Lösung und Durchschütteln ist die Reaktions-Lösung, die sich langsam rot zu färben beginnt, meßbereit.



Abbild. 6.  $tg\alpha$  in Abhängigkeit von der Fermentkonzentration (bei vier verschiedenen Kartoffelpreßsäften: ●-●, ○-○, △-△ x-x).

Messung: Zur Ermittlung des Nullwertes wird die mit Puffer-Lösung gefüllte Cuvette (20 mm Schichtdicke) eingesetzt, die Meßtrommel auf Null gestellt und durch Einstellen der Vergleichsblende bis zur Einspielung des Galvanometers auf den Nullpunkt Vergleichsintensität und wirksame Intensität in Übereinstimmung gebracht. Der nach Füllung der Cuvette mit der Meßlösung sich gemäß der Lichtabsorption einstellende Galvanometerausschlag wird durch Stellungenänderung der Meßzelle durch Drehen der Meßtrommel ausgeglichen (Rückgang des Galvanometerausfalls auf Null), wobei die Farbintensität der Lösung der Anzahl der Skalenteile entspricht.

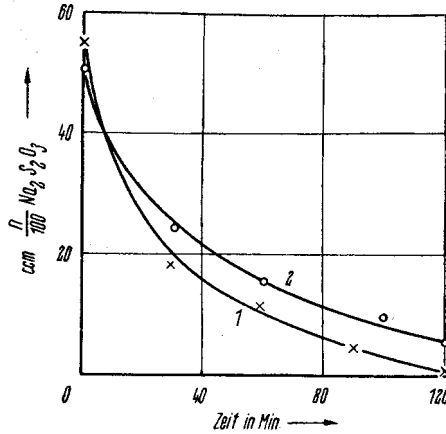
Zur Ermittlung der Farbvertiefung als Maß für die vorliegende Fermentkonzentration wird die Messung nach entsprechenden Zeiten wiederholt (1. Messung nach 10 Min., 2. Messung nach weiteren 30 Min.). Da sich die Anzahl Skalenteile aus der Differenz zweier Ablesungen ergibt, ist die Einstellung des Nullwertes nur einmal erforderlich. Der Nullwert ist daher zweckmäßig so zu justieren, daß ein möglichst großer Meßbereich auf der Trommel zur Verfügung steht.

Zwei an demselben Enzymsaft unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführte Messungen zeigen innerhalb der angegebenen Genauigkeit liegende Übereinstimmung: 1) beobachtet nach 10 Min.: 80 Skalenteile, nach insgesamt 40 Min.: 455 Skalenteile;  $tg\alpha = \Delta S_{kt} / \Delta t = 375/30 = 12.5$ ; 2.) beobachtet nach 10 Min.: 75 Skalenteile, nach insgesamt 40 Min. 440 Skalenteile;  $tg\alpha = 365/30 = 12.2$ ; mittlere Abweichung  $\pm 1.2\%$ . Um auf eine Eigenfärbung des Safts zu prüfen, wurden Ansatzlösungen ohne Tyrosin gemessen und ausnahmslos festgestellt, daß  $tg\alpha = 0$  ist.

Tyrosin-Bestimmung: Vor der maßanalytischen Bestimmung des unverbrauchten Tyrosins mußte das überschüss. Wasserstoffperoxyd entfernt werden, wobei sich die Verwendung von kolloidalem Platin als zweckmäßig erwies. Das Platinsol wurde durch Lichtbogenzerstäubung nach Bredig hergestellt (zweifach dest. Wasser, 110 V Gleichstrom, 3-4 Amp., Elektrodenabstand 2-3 mm). Es wurde festgestellt, daß eine ausreichende Zerstörung des Peroxyds in der dem Reaktionsansatz jeweils entnommenen Probe nach Zusatz von 5 cm der frisch hergestellten Platin-Lösung durch 6 Min. langes Aufkochen erfolgt. Die anschließende Tyrosintitration erfolgte genau nach der Vorschrift von Haehn und Stern<sup>14</sup>).

Einfluß der Katalase: Hierfür wurde die Zersetzung des Wasserstoffperoxyds durch den Fermentkomplex bei Ab- und Anwesenheit von Tyrosin durch jodometrische Bestimmung zeitlich verfolgt und festgestellt, daß bereits in 30 Min. die Wasserstoffperoxyd-Konzentration um 65% absinkt (Kurve 1, Abbild. 7). Der Abfall der Peroxyd-Konzen-

tration ist in Ggw. von Tyrosin etwas geringer (Kurve 1, Abbild. 7), sinkt um etwa 50% ab. Aber auch diese Geschwindigkeit genügt, um den für die Tyrosinoxydation notwendigen Sauerstoff zur Verfügung zu stellen.



Abbild. 7. Wasserstoffperoxyd-Zersetzung durch Katalase in Kartoffelpreßsaft in Abwesenheit (Kurve 1) und Anwesenheit (Kurve 2) von Tyrosin.

Kinetische Untersuchung: Raper und Wormall<sup>9)</sup> haben angegeben, daß die Tyrosinasereaktion in bezug auf das Verschwinden des Tyrosins monomolekular verläuft. Auch Haehn und Stern<sup>31)</sup> beobachteten eine befriedigende Konstanz der k-Werte für den monomolekularen Reaktionsverlauf. R. Weidenhagen und F. Heinrich<sup>12)</sup> konnten den Befund nicht bestätigen; sie beobachteten auch bei vielfältig variierten Versuchsbedingungen mit zunehmender Reaktionsdauer eine starke Zunahme der k-Werte.

Entsprechend der bei der colorimetr. Bestimmung notwendigen Verwendung von Wasserstoffperoxyd wurden auch diese kinetischen Versuche in Gegenwart von Peroxyd statt Luft durchgeführt und in Übereinstimmung mit den Angaben von Weidenhagen und Heinrich gemäß der Tafel 5 ein starker Gang von k bei Annahme einer monomolekularen Reaktion gefunden.

Tafel 5. Die Reaktion im System Tyrosin-Wasserstoffperoxyd in Gegenwart von Tyrosinase bei Annahme eines monomolekularen Reaktionsverlaufs (Kartoffelpreßsaft).

$$k = 2.303/t_2 - t_1 \times \log a/a-x$$

t'	t <sub>2</sub> - t <sub>1</sub>	a - x	k × 10 <sup>-4</sup>
0	—	52.87	—
30	30	51.93	5.20
60	30	50.83	7.17
90	30	49.31	9.95
120	30	48.21	7.59

Der Reaktionsverlauf i. Ggw. von Wasserstoffperoxyd scheint also durchaus mit dem bei Luftgegenwart vergleichbar zu sein, vermutlich infolge der Gegenwart von Katalase, die aus dem Peroxyd den notwendigen Sauerstoff abspaltet. Leider haben unsere Versuche, die Katalase aus dem System durch selektive Adsorption zu entfernen, wodurch eine weitere Klärung der Reaktion ermöglicht wäre, noch nicht zum Ziel geführt, da bei den verwendeten Adsorptionsmitteln, wie frisch gefälltem Tricalciumphosphat<sup>32)</sup>, nach unseren Feststellungen auch Tyrosinase vollständig adsorbiert wird.

<sup>31)</sup> Fermentforsch. 9, 395 [1928].

<sup>32)</sup> K. Agner, Ztschr. physiol. Chem. 235, Nr. 3/4 [1935] (C. 1935 II, 3120).