

A. N. BELOSERSKI · N. I. PROSKURJAKOW

**PRAKTIKUM
DER BIOCHEMIE
DER PFLANZEN**

DEUTSCHER VERLAG DER WISSENSCHAFTEN

HOCHSCHULBÜCHER FÜR BIOLOGIE

Herausgegeben von Prof. Dr. Heinrich Borriß und Prof. Dr. Manfred Gersch

B a n d 2

Praktikum der Biochemie der Pflanzen

von

A. N. BELOSERSKI und N. I. PROSKURJAKOW

unter Mitarbeit von Akademiemitglied A. I. Oparin

Deutsche Ausgabe mit Zusatzkapiteln von H. BORRIß

Mit 43 Abbildungen

1956

VEB DEUTSCHER VERLAG DER WISSENSCHAFTEN
BERLIN

А. Н. Белозерский
Н. И. Проскуряков,

„Практическое руководство по
биохимии растений“

Государственное издательство „Советская наука“
Москва 1951

Übersetzung von Prof. Dr. Johannes Dembowski
Wissenschaftliche Redaktion von Prof. Dr. Heinrich Borriss

Verantwortl. Verlagsredakteurin: Dipl.-Biol. Thea Creutziger
Alle Rechte vorbehalten

Copyright 1956 by VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin
Lizenz-Nr. 206-435/46/56

Satz und Druck: VEB Druckerei der Werktätigen, Halle (Saale)

INHALTSVERZEICHNIS

1. ABSCHNITT

Kohlenhydrate	15
I. Qualitative Reaktionen auf Kohlenhydrate	15
1. Farbreaktionen	15
2. Oxydationsreaktionen der Kohlenhydrate (Reaktionen vom Oxydations-Reduktions-Typ)	18
3. Reaktionen mit Phenylhydrazin	19
II. Quantitative Bestimmung der Kohlenhydrate	22
1. Bestimmung der reduzierenden Zucker (nach BERTRAND)	22
2. Mikrobestimmung der Glucose (nach BIERRY)	26
3. Bestimmung der Aldosen auf jodometrischem Wege (nach WILLSTÄTTER und SCHUDEL)	28
4. Mikrobestimmung des Zuckers (nach HAGEDORN-JENSEN)	30
5. Bestimmung der Pentosen	32
6. Bestimmung der Aminosucker	37
7. Bestimmung der Uronsäuren	39
8. Kolorimetrische Bestimmung der Uronsäuren	41
9. Bestimmung von Mannit	42
10. Direkte Bestimmung der Stärke (nach N. I. PROSKURJAKOW und A. N. KOSHEWNIKOWA)	43
11. Direkte Bestimmung der Cellulose	43
12. Polarimetrische Bestimmung der Zucker	44
III. Quantitative Bestimmung verschiedener Kohlenhydrate in einer Probe	47
1. Vorbereitung des Materials zur Analyse	48
2. Herrichtung des Analysenmaterials	51
3. Fraktionierte Bestimmung der Kohlenhydrate	51
IV. Präparative Darstellung einiger Kohlenhydrate und ihnen nahestehender Produkte	61
1. Darstellung von <i>l</i> -Arabinose	61
2. Darstellung von Xylose	62
3. Darstellung von Inulin	63
4. Darstellung von Maltose auf enzymatischem Wege	63
5. Darstellung von Hexosediphosphat	64
6. Darstellung von Glucose-1-Phosphat (Cori-Ester) auf enzymatischem Wege	66
7. Enzymatische Synthese stärkeähnlicher Stoffe	67
8. Darstellung von Phytin aus Kleie	67
9. Darstellung von Amygdalin	69
10. Darstellung des Digitonins (nach W. N. BUKIN und I. N. GARKINA)	69

2. ABSCHNITT

Fette und Lipide	71
I. Darstellung und quantitative Bestimmung der Fette und Lipide	71
1. Quantitative Bestimmung der freien Fette und Lipide	71
2. Bestimmung gebundener Lipide	73
3. Bestimmung der Fette durch Verseifen	75
4. Präparative Darstellung von Fett zur Analyse	76
5. Präparative Darstellung von Phosphorlipiden (Phosphatiden)	78
6. Quantitative Bestimmung der Sterine	82
7. Präparative Darstellung von Ergosterin	86
II. Analyse der Fette und Lipide	87
A. Bestimmung der chemischen Konstanten der Fette	87
1. Säurezahl	87
2. Bestimmung der freien Säuren und des Neutralfettes	88
3. Verseifungszahl und Esterzahl	89
4. Bestimmung der gebundenen Fettsäuren	90
5. Jodzahl	92
6. Acetyl- und Hydroxylzahlen	93
7. Peroxydzahl	96
8. Kombinierte Bestimmung der Kennzahlen in einer Einwaage	96
B. Zerlegung des Fettes in seine Bestandteile	97
1. Hydrolyse des Fettes	98
2. Trennung der Produkte der Fettverseifung	98
3. Bestimmung des Glycerins	112
C. Qualitative Reaktionen auf Fett	114
D. Zerlegung der Phosphorlipide in ihre Bestandteile	114

3. ABSCHNITT

EiweiÙe, ihre Zerfalls- und Umwandlungsprodukte	117
I. Bestimmung des gebundenen Stickstoffs	117
1. Bestimmung des Gesamtstickstoffs (nach KJELDAHL)	117
2. Mikrobestimmung des Stickstoffs	120
3. Bestimmung des EiweiÙ-Stickstoffs und des NichteiweiÙ-Stickstoffs	122
4. Bestimmung des Ammoniaks	124
5. Mikrobestimmung des Ammoniaks nach dem Diffusionsverfahren	126
6. Bestimmung des Amidstickstoffs	128
7. Bestimmung des basischen Stickstoffs	130
8. Gasometrische Bestimmung des Aminostickstoffs	132
9. Bestimmung des Aminostickstoffs durch Formoltitration (nach der Modifikation von N. I. GAWRILOW)	139
10. Bestimmung des Aminostickstoffs nach der Kupfermethode	141
11. Bestimmung der Carboxylgruppen	143
12. Bestimmung freier Säuren mit Ninhydrin	144
13. Bestimmung des Stickstoffs der Purinbasen	147

II. Eiweißgewinnung aus pflanzlichem Material	149
1. Allgemeine Bemerkungen	149
2. Darstellung einiger Eiweiße	158
3. Charakterisierung der gewonnenen Eiweißpräparate	165
III. Reaktionen auf Eiweiß	165
1. Farbreaktionen	165
2. Fällungsreaktionen	168
IV. Hydrolyse des Eiweißes und quantitative Bestimmung einiger Aminosäuren	169
1. Hydrolyse und Fraktionierung des Hydrolysats	169
2. Quantitative Bestimmung einiger Aminosäuren	181
V. Trennung und Identifizierung der Aminosäuren mit Hilfe der Papierchromatographie	202
1. Einführung	202
2. Grundlagen der papierchromatographischen Methode	204
3. Reagenzien und Apparatur für ein Verteilungschromatogramm auf Papier	205
4. Vorbereitung des Materials zur chromatographischen Untersuchung	208
5. Herstellung eines eindimensionalen Chromatogramms	208
6. Zweidimensionale Chromatographie	212
7. Identifizierung und Entwicklung der Aminosäuren auf Chromatogrammen	214
8. Ausführung „aufsteigender“ Chromatogramme	216
9. Quantitative Bestimmung der Aminosäuren auf dem Papier	217
VI. Darstellung von Aminosäuren	219
1. Darstellung von Cystin	219
2. Darstellung von Glutaminsäure	220
3. Darstellung von Tyrosin	221
4. Darstellung von Arginin	222
5. Darstellung von Glutamin (nach W. L. KRETOWITSCH)	223
6. Darstellung von reduziertem Glutathion	224
VII. Nucleoproteide und Nucleinsäuren	225
1. Allgemeine Grundlagen der Abtrennung von Nucleoproteiden	225
2. Eigenschaften der Nucleoproteid-Präparate	227
3. Darstellung von strukturiertem Nucleoproteid aus Weizenkeimen (nach MIRSKI)	229
4. Bestimmung der Nucleinsäuren nach dem Phosphorgehalt	230
5. Quantitative Bestimmung der Thymonucleinsäure mit Diphenylamin	232
6. Darstellung von Ribonucleinsäure aus Hefe	233
7. Darstellung von Thymonucleinsäure	234
8. Darstellung von Adenin, Guanin und Thymin aus Thymonucleinsäure	237
VIII. Alkaloide	238
1. Qualitative Reaktionen	238
2. Allgemeine Verfahren zur Abtrennung und Bestimmung von Alkaloiden	239
3. Bestimmung des Nicotins (in der Modifikation von A. A. SCHMUK)	240
4. Bestimmung des Coffeins (in der Modifikation von A. L. KURSANOW)	241

4. ABSCHNITT

Fermente	243
I. Hydrolytische Fermente	246
1. Lipase	246
2. Maltase	251
3. β -Glucosidase	252
4. Invertase (Saccharase)	256
5. Amylase	261
6. Proteolytische Fermente	269
7. Urease	279
II. Desmolytische Fermente	284
1. Fermente und Cofermente der Alkoholischen Gärung	284
2. Tyrosinase	290
3. Katalase	293
4. Dehydrasen	296
5. Peroxydase	298
III. Methoden zur quantitativen Bestimmung der Fermentwirkung in der lebenden Zelle (Vakuuminfiltration)	305

5. ABSCHNITT

Trennung und Identifizierung der Gärungsprodukte	310
1. Allgemeine Bemerkungen	310
2. Qualitative Reaktionen auf neutrale Gärungsprodukte	314
3. Quantitative Bestimmung der neutralen Gärungsprodukte	316
4. Qualitative Reaktionen auf flüchtige Säuren der Fettreihe	325
5. Schnelle Identifizierung flüchtiger Fettsäuren in Gemischen	327
6. Bestimmung der flüchtigen Säuren (nach DUCLAUX)	328
7. Bestimmung flüchtiger Fettsäuren als Silbersalze	332
8. Quantitative Bestimmung der einzelnen flüchtigen Fettsäuren	333
9. Mikromethode zur Bestimmung der Citronensäure (nach N. A. KOMETIANI und G. G. STURUA)	337

6. ABSCHNITT

Vitamine, Pigmente, Gerbstoffe, Kautschuk und Guttapercha — Stufenphotometer nach PULFRICH	339
I. Vitamine	339
1. Fluorometrische Methoden zur Bestimmung der Vitamine B ₁ und B ₂ (modifiziert nach W. N. BUKIN)	339
2. Bromrhodanidmethode zur Bestimmung der Nicotinsäure oder des Niacins in Nahrungsmitteln (nach W. M. JOSIKOWA)	344
3. Bestimmung des Vitamins C (nach S. M. PROKOSCHEW)	346

II. Pigmente	348
1. Quantitative Bestimmung des Chlorophylls (nach T. N. GODNJEV)	348
2. Darstellung von Chlorophyll A und B (modifiziert nach O. P. OSSIPOVA)	348
3. Quantitative Bestimmung des Carotins (modifiziert nach T. N. GODNJEV)	352
III. Gerbstoffe	353
1. Qualitative Reaktionen	353
2. Quantitative Bestimmung von Gerbstoffen durch Titration	354
IV. Bestimmung von Kautschuk und Guttapercha	355
1. Extraktionsmethode	355
2. Alkalimethode (nach O. J. SOBOLEWSKI)	356
V. Stufenphotometer nach PULFRICH	356

7. ABSCHNITT

Hilfsanalysen	362
1. Aufschluß des Materials zur Phosphorbestimmung	362
2. Methoden zur Bestimmung des Phosphors	363
3. Bestimmung des Schwefels	366
4. Bestimmung der Halogene in organischen Verbindungen	367
5. Mikrobestimmung von Kupfer	368
6. Bestimmung von Eisen	368

8. ABSCHNITT

Die Anwendung manometrischer Methoden (Warburg-Apparatur) bei stoffwechselfysiologischen und biochemischen Untersuchungen (von H. BORRISS)	370
I. Aufbau und Anwendung der Warburg-Apparatur	371
1. Die Manometer	371
2. Die Manometer-Gefäße	372
3. Die Bestimmung des Gefäßinhaltes	372
4. Wasserbad mit Schütteleinrichtung	374
5. Die Schüttelgeschwindigkeit	374
6. Die Berechnung der Gefäßkonstanten	375
7. Das Thermobarometer	376
II. Bestimmung des Gasstoffwechsels von Hefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	377
1. Allgemeines	377
2. „Direkte“ Methode zur Bestimmung des Gasstoffwechsels von Hefezellen	378
III. Manometrische Untersuchung der Photosynthese	383
IV. Die Bestimmung der Tyrosinase-Aktivität auf manometrischem Wege	384

9. ABSCHNITT

Biologische und chemische Methoden zum Nachweis der pflanzlichen Streckungswachstumsstoffe (Auxine) (von H. BORRISS)	389
--	-----

I. Die Gewinnung des Wuchsstoffes aus Pflanzengewebe	390
1. Das Diffusionsverfahren	390
2. Das Extraktionsverfahren	392
3. Reinigung der Extrakte durch Papierchromatographie und Papierelektrophorese	395
II. Die biologischen Wuchsstoffteste	398
1. Krümmungsteste	398
2. Zuwachsteste	403

10. ABSCHNITT

Reagenzien und Lösungen	406
1. Normallösungen	406
2. Indikatoren	408
3. Reagenzien	409
4. Herstellung von trockenem Äther, absolutem Alkohol und alkoholischer Lauge	414
5. Reinigung der Essigsäure von Aldehyden	415
6. Adsorbentien für Fermentpräparate	416

11. ABSCHNITT

Nachschlagetabellen	419
Literaturnachweis	426
Sachregister	429

A. N. BELOSERSKI / N. I. PROSKURJAKOW
PRAKTIKUM DER BIOCHEMIE DER PFLANZEN

HOCHSCHULBÜCHER FÜR BIOLOGIE

Herausgegeben von Prof. Dr. Heinrich Borriß und Prof. Dr. Manfred Gersch

B a n d 2

Praktikum der Biochemie der Pflanzen

von

A. N. BELOSERSKI und N. I. PROSKURJAKOW

unter Mitarbeit von Akademiemitglied A. I. Oparin

Deutsche Ausgabe mit Zusatzkapiteln von H. BORRIß

Mit 43 Abbildungen

1956

VEB DEUTSCHER VERLAG DER WISSENSCHAFTEN
BERLIN

А. Н. Белозерский
Н. И. Проскураков,
„Практическое руководство по
биохимии растений“

Государственное издательство „Советская наука“
Москва 1951

Übersetzung von Prof. Dr. Johannes Dembowski
Wissenschaftliche Redaktion von Prof. Dr. Heinrich Borriss

Verantwortl. Verlagsredakteurin: Dipl.-Biol. Thea Creutziger
Alle Rechte vorbehalten
Copyright 1956 by VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin
Lizenz-Nr. 206-435/46/56
Satz und Druck: VEB Druckerei der Werktätigen, Halle (Saale)

VORWORT ZUR DEUTSCHEN AUSGABE

Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß die außerordentlichen Fortschritte, die im letzten Vierteljahrhundert auf dem Gebiet der Pflanzenphysiologie erreicht wurden, zu einem wesentlichen Teil der immer breiteren Anwendung biochemischer Methoden zu verdanken sind. Dies gilt nicht nur für den Bereich der Stoffwechselfysiologie, in dem so schwer angreifbare, aber fundamental wichtige Lebensvorgänge wie die Photosynthese oder die Bindung des molekularen Stickstoffs ihre Geheimnisse preiszugeben beginnen. Biochemische Untersuchungsmethoden haben in immer steigendem Maße Eingang in das Gebiet der pflanzlichen Wachstums- und Entwicklungsphysiologie gefunden und auch hier unsere Einsichten in das physiologische Geschehen wesentlich vertieft. Als Beispiel sei etwa der Bereich der Wuchsstoffforschung erwähnt, in dem die Durchdringung physiologischer und biochemischer Forschungsmethoden besonders innig ist und bereits zu manchen bemerkenswerten Erfolgen geführt hat.

Dieser Situation hinsichtlich der Forschung steht auf dem Gebiet der Lehre die Tatsache gegenüber, daß bei der Ausbildung der Studierenden in den Botanischen Instituten sehr häufig stärker am Althergebrachten festgehalten wird als bei der stürmischen Entwicklung unserer Wissenschaft verantwortet werden kann. Die Gründe hierfür sind mannigfach: Neben personellen gibt es vor allem materielle Schwierigkeiten, da die Botanischen Institute der deutschen Universitäten und Hochschulen zwar gewöhnlich über Mikroskopiersäle nebst dem zugehörigen Instrumentarium, in den seltensten Fällen jedoch über Laboratorien für ein großzügiges biochemisches Arbeiten zahlreicher Studenten verfügen.

Das hier in deutscher Übersetzung vorgelegte „Praktikum der Biochemie der Pflanzen“ läßt erkennen, um wie vieles anders und besser die Dinge in der Sowjetunion liegen müssen. Dem Vorwort seiner beiden Verfasser ist zu entnehmen, daß es dort eigene Institute (Lehrstühle) für Biochemie der Pflanzen gibt, in denen große Praktika für Studierende durchgeführt werden, die sich auf das Fach „Biochemie der Pflanzen“ spezialisieren wollen, und an denen die Möglichkeit besteht, die übrigen Angehörigen der Biologischen

Fakultäten durch Kurse in dieses für jeden Biologen wichtige Fach einzuführen. Der vielseitige Inhalt des Buches zeigt, in welchem Umfang diese Ausbildung erfolgt. Neben einfachen Methoden zum qualitativen Nachweis der wichtigsten Pflanzenstoffe finden sich in ihm komplizierte quantitative Bestimmungsmethoden und präparative Verfahren, die hohe Anforderungen an die Geschicklichkeit der Praktikanten stellen und Erfahrung im chemischen Arbeiten voraussetzen, die im Laufe der allgemeinen chemischen Ausbildung erworben werden muß. Für den Biologen, bei dem solche Erfahrungen nur in beschränktem Umfang vorausgesetzt werden können, ist es sicher von Vorteil, daß die Anweisungen meistens recht ausführlich gehalten sind und auch Handgriffe beschreiben, die Geübteren selbstverständlich erscheinen müssen. Die Tatsache, daß die Verfasser auf eine zwanzigjährige Unterrichtserfahrung zurückblicken und den größten Teil der beschriebenen Verfahren vielfach geprüft haben, gibt die Gewißheit, daß der Praktikant, der die Anweisungen befolgt, auch zu dem gewünschten Resultat gelangt.

Zwar gibt es auch in deutscher Sprache zahlreiche Bücher, die über Nachweis- und Bestimmungsmethoden oder Verfahren zur präparativen Darstellung von Pflanzenstoffen unterrichten, jedoch sind diese Werke, in erster Linie das grundlegende Handbuch von KLEIN und das neue Werk von PAECH und TRACEY, den Studierenden nicht ohne weiteres zugänglich. Eine knappe Darstellung, die in die Praxis des biochemischen Arbeitens mit pflanzlichem Material einführt und darüber hinaus auch dem Geübteren wertvolle Informationen zu geben vermag, existiert im deutschsprachigen Schrifttum nicht. Damit scheint die Berechtigung und — berücksichtigt man das im Anfang Gesagte — Notwendigkeit der vorliegenden Übersetzung hinlänglich begründet, die zugleich den zweiten Band der „Hochschulbuchreihe Biologie“ darstellt. In dieser Reihe werden in rascher Folge vorwiegend solche Bücher deutscher und ausländischer Autoren erscheinen, für die nach Ansicht der Herausgeber ein besonderes Bedürfnis seitens der Studierenden besteht, die an den Biologischen Instituten unserer Universitäten und Hochschulen ausgebildet werden.

Bei der für jeden biochemisch Arbeitenden besonders wichtigen manometrischen Methode nach Warburg wird im Original auf das „Praktikum der Biochemie der Tiere“ von Meschkowa und Sewerin verwiesen, das schon aus sprachlichen Gründen nur wenigen Benutzern der Übersetzung zugänglich sein dürfte. Es schien deshalb erforderlich, einen kurzen Abschnitt über Prinzip und Anwendung manometrischer Methoden einzufügen. Auch über

die Verfahren der pflanzlichen Wuchsstoff-Forschung, die in den letzten Jahren besondere Fortschritte zu verzeichnen hatte, im 1951 erschienenen Original jedoch noch keine Berücksichtigung fand, wurde in einem kurzen Abschnitt das Wichtigste mitgeteilt. Einige weitere Ergänzungen und Hinweise in Form von Fußnoten sind als „Anmerkung des Herausgebers“ (A. H.) gekennzeichnet.

Die Literaturangaben, die sich im wesentlichen auf die wichtigsten Lehr- und Handbücher des Gebietes, die in russischer Sprache vorliegen, beschränken, sind durch einige deutsche und ausländische einschlägige Werke und Originalarbeiten ergänzt worden, die unseren Studierenden leichter zugänglich sein dürften als die im Original genannten Titel.

Für die bereitwilligst erteilte Genehmigung, diese Ergänzungen vornehmen zu dürfen, sind Herausgeber und Verlag den entsprechenden sowjetischen Stellen zu aufrichtigem Dank verpflichtet. Dank gebührt weiter der Leitung des Deutschen Verlages der Wissenschaften, Berlin, die in großzügiger Weise auf alle Wünsche hinsichtlich der Druckausstattung einging und bei den auftretenden Verzögerungen in der Vorbereitung des Manuskriptes nicht die Geduld verlor. Schließlich sei meinen Mitarbeitern, Herrn Dr. SCHNEIDER und Herrn Dr. GÜNTHER, gedankt. Dr. GÜNTHER stellte die Versuchsergebnisse für den Abschnitt über die manometrischen Methoden zur Verfügung, Dr. SCHNEIDER unterstützte mich bei der Durchsicht des Manuskriptes und beim Lesen der Korrekturen.

H. BORRISS

VORWORT

Das vorliegende „Praktikum der Biochemie der Pflanzen“ ist in seinen Grundzügen in Übereinstimmung mit dem Lehrplan des großen Praktikums für Studenten zusammengestellt, die sich für Biochemie der Pflanzen spezialisieren.

Das Material ist in dem Praktikum so angeordnet, daß es dem Plan der im Laboratorium durchzuführenden Arbeiten entspricht.

20 Jahre Erfahrungen mit Studenten der Staatlichen Moskauer Universität haben gezeigt, daß eine solche Anordnung des Materials und die systematische und vertiefte Orientierung über die Methoden der biochemischen Analyse völlig gerechtfertigt sind. Die dargelegten Methoden erlauben es den Studenten, praktische Erfahrungen zu sammeln, die für das Studium des Stoffwechsels im pflanzlichen Organismus notwendig sind.

Das vorliegende Praktikum kann auch zur Durchführung des kleinen Praktikums der Biochemie der Pflanzen benutzt werden.

Einzelne Abschnitte des Praktikums sind etwas erweitert, z. B. die Methoden der Untersuchung von Eiweißen, Fermenten, Kohlenhydraten und Fetten, weil die Studenten oft im Rahmen ihrer individuellen Aufgaben diese oder jene Fragen eingehender bearbeiten.

Diese Tatsache erlaubt es unserer Meinung nach, daß das vorliegende Praktikum von Diplomanden, Aspiranten und von Mitarbeitern an wissenschaftlichen Forschungsanstalten benutzt werden kann.

Dafür fehlt in diesem Praktikum die Beschreibung einiger Apparate und ihrer Anwendung.

Die überwiegende Mehrzahl der angeführten Methoden wurde des öfteren am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen der Moskauer Staatlichen Universität erprobt.

Das Kapitel über die Anwendung der Papierchromatographie zur Identifizierung der Aminosäuren schrieb T. S. PASCHINA.

Wir betrachten es als angenehme Pflicht, dem Akademiemitglied A. I. OPARIN, Inhaber des Lehrstuhls für Biochemie der Pflanzen an der Moskauer Staatlichen Universität, sowie den Mitarbeitern dieses Lehrstuhles H. P. SERENKOW, T. N. JEWREINOWA, A. M. KORNEJEW und der Redakteurin des Buches, M. P. SNAMENSKAJA, für eine Reihe wertvoller Bemerkungen und Hinweise unseren aufrichtigen Dank auszusprechen.

Für alle kritischen Bemerkungen und Hinweise sagen die Verfasser im voraus ihren aufrichtigen Dank.

A. BELOSERSKI und N. PROSKURJAKOW