

22.2 ccm Wasser, 10 ccm Fermentlösung mit Acetatpuffer auf 100 ccm aufgefüllt. Von beiden Ansätzen wurde je eine Probe von 10 ccm sofort neutralisiert und die Ansätze sodann bei 37° aufbewahrt. Zu Beginn des Versuches enthielten beide Ansätze praktisch keine freie Phosphorsäure. Nach 4 Tagen wurden weitere 3 ccm Fermentlösung zugegeben und der Ansatz mit Acetatpuffer auf das Doppelte des vor dem Fermentzusatz noch vorhandenen Volumens aufgefüllt. Zur Probe wurden je 10 ccm entnommen, die mit $n/10$ -NaOH gegen Phenolphthalein neutralisiert wurden. Die neutralisierte Probe wurde sodann mit 10 ccm einer 10-proz. Trichloressigsäure-Lösung versetzt, das ausgefallene Eiweiß abfiltriert, mit trichloressigsäurehaltigem Wasser ausgewaschen und die freie Phosphorsäure nach Teorell¹¹⁾ spektrophotometrisch bestimmt.

Tafel 3.

Versuchsdauer in Tagen	Verbraucht ccm $n/10$ -NaOH			Zuwachs in Äquiv.	Gesamt- äqui- valent	abgespaltener P	
	Haupt- versuch	Kontroll- versuch	Gesamt- zunahme			mg je Probe	% Ge- samt-P
0	9.48	9.83	—	—	4.97	—	—
$\frac{1}{4}$	9.90	9.72	0.53	1.20	6.17	1.295	23.6
1	10.07	9.73	0.16	0.36	6.53	2.075	37.8
2	10.23	9.79	0.10	0.225	6.76	2.680	48.9
4	10.25	9.67	0.14	0.315	7.07	3.350	61.2
Ferment- zusatz							
—	8.25	7.93	—	—	7.07	—	—
5	8.33	7.96	0.05	0.225	7.30	1.842	67.3
7	8.38	7.96	0.05	0.225	7.52	2.060	75.2
11	8.41	7.96	0.03	0.14	7.66	2.240	81.8

25. Hellmut Bredereck und Martin Köthnig: Zur Konstitution der Polynucleotide: Über die Basizität der Thymonucleinsäure (Nucleinsäuren, XIII. Mitteil. *).

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.]

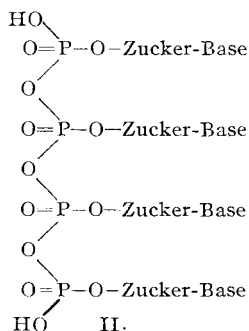
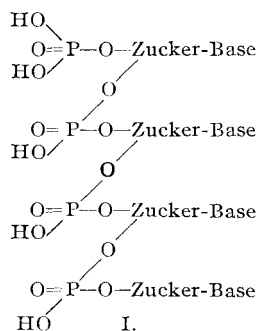
(Eingegangen am 19. Dezember 1938.)

Im Gegensatz zu den Ribo-nucleotiden der Hefenucleinsäure, deren Konstitution aufgeklärt ist, ist diejenige der in der Thymonucleinsäure vorliegenden Desoxyribo-nucleotide noch nicht mit Sicherheit bekannt. Man darf jedoch mit sehr großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die Phosphorsäure in diesen Desoxyribo-nucleotiden analog den Ribo-nucleotiden am C-Atom 3 der Desoxyribose sitzt. Trotz dieser Unsicherheit hat man schon seit längerer Zeit die Fragen nach der Art der Verknüpfung der einzelnen Nucleotide im Molekül der Thymonucleinsäure zu beantworten gesucht.

¹¹⁾ Biochem. Ztschr. **230**, 1; **232**, 485 [1931].

*) XII. Mitteil.: s. voranstehende Mitteil.

Es herrscht heute die einheitliche Auffassung, daß die Verknüpfungen der einzelnen Nucleotide in der Thymonucleinsäure jeweils über die Phosphorsäuregruppen verlaufen. Während Levene¹⁾ eine esterartige Verknüpfung zwischen Phosphorsäure und Zuckerhydroxyl (am C-Atom 5) im Sinne des Schemas I annimmt, ziehen Thannhauser und Klein²⁾ eine Anhydridbindung zwischen den Phosphorsäure-Resten (Schema II) in Erwägung. Levene und Mitarb. glauben den Beweis für die esterartige Bindung in der Isolierung von Derivaten der Thymin-desoxyribosid- und Cytosin-desoxyribosid-diphosphorsäure zu sehen, während Thannhauser und Klein vornehmlich auf Grund fermentchemischer Untersuchungen die Anhydridform II vorschlagen. In einer früheren Mitteilung³⁾ konnten wir zeigen, daß wir keinen klaren Beweis für das Vorliegen von Diphosphorsäure-estern sehen. Andererseits konnten wir die Möglichkeit von Bindungen zwischen Amino-gruppen (in den Basen) und Phosphorsäuregruppen ausschalten⁴⁾.



Thymonucleinsäure stellt im Sinne der Leveneschen Formel eine 5-basische Säure dar, unter Annahme der Formel von Thannhauser und Klein eine 2-basische Säure. Levene und Simms⁵⁾ glauben durch die elektrometrische Titration den 5-basischen Charakter der Hefenucleinsäure, mit gewissen Einschränkungen auch den der Thymonucleinsäure, bestätigt zu haben, während Thannhauser und Klein darauf hinweisen, daß die Nucleinsäure-Präparate nicht so rein sind, um eine solch sichere Entscheidung zu treffen. Zweifellos sind die Ergebnisse der elektrometrischen Titration bei den amorphen unreinen Polynucleotiden nicht in dem Maße wie bei kristallisierten Substanzen, z. B. Nucleotiden, auszuwerten. Wir haben vor einigen Jahren, ebenso wie Makino⁶⁾, festgestellt, daß sich Nucleotide mit Alkali gegen Phenolphthalein glatt als 2-basische Säuren titrieren lassen. Makino⁶⁾ hat dann den bei der Aufspaltung der Hefe- bzw. Thymonucleinsäure eintretenden Aciditätszuwachs durch Titration bestimmt. Er findet bei beiden Polynucleotiden einen Aciditätszuwachs von 4 Äquivalenten.

¹⁾ Levene u. Tipon, Journ. biol. Chem. **109**, 623 [1935].

²⁾ Thannhauser, „Stoffwechselprobleme“, Berlin 1934; Klein u. Rossi, Ztschr. physiol. Chem. **231**, 104 [1935].

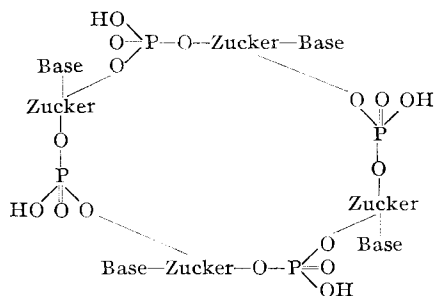
³⁾ Bredereck u. Caro, Ztschr. physiol. Chem. **253**, 170 [1938].

⁴⁾ Bredereck, Köthnig u. Lehmann, B. **71**, 2613 [1938].

⁵⁾ Journ. biol. Chem. **65**, 519 [1925]; **70**, 327 [1926].

⁶⁾ Ztschr. physiol. Chem. **232**, 229 [1935]; **236**, 201 [1935].

Makino kommt daher sowohl für Hefe- als auch Thymonucleinsäure zu einer ringförmigen Anordnung (III).



Mit der Annahme einer ringförmigen Anordnung steht Makino in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Fermentuntersuchungen von Takahashi⁷⁾ und neuerdings Gulland⁸⁾. Takahashi fand, daß Phosphomonoesterase und Pyrophosphatase, sowohl einzeln als auch beide zusammen, aus Hefenucleinsäure keine Phosphorsäure freilegen, während durch gemeinsame Einwirkung von Phosphomono- und Phosphodiesterase eine 100-proz. Phosphorsäure-Abspaltung erfolgt. Klein⁹⁾ konnte diese Versuche, insbesondere was die Einheitlichkeit der verwendeten Phosphodiesterase anbetrifft, nicht bestätigen. Mit Phosphomono- und -diesterase-Präparaten, allerdings anderer Herkunft, konnte Gulland⁷⁾ bei der Hefenucleinsäure im wesentlichen die Angaben von Takahashi bestätigen, wobei er jedoch nur eine 75-proz. Phosphorsäure-Abspaltung findet.

Wie in einer früheren Mitteilung⁴⁾ gezeigt ist, fanden wir in der durch Desaminierung der Thymonucleinsäure erhaltenen Verbindung Titrationswerte, die auf eine 5-basische Säure hindeuten. Wir haben daher die Thymonucleinsäure selbst eingehend auf ihre Basizität untersucht.

Die von uns nach dem früher³⁾ beschriebenen Verfahren aus Milz hergestellte Thymonucleinsäure ergab vor ihrer Reinigung bei der Titration mit Alkali gegen Phenolphthalein eine Äquivalenzzahl von 4.0. Diese Zahl mußte in Wirklichkeit wesentlich höher liegen, wenn man die erheblichen Verunreinigungen dieses Präparates — insbesondere Fe — mit berücksichtigte. Entfernten wir nach einer gegenüber früher abgeänderten Methode (s. voranstehende XII. Mitt.) das als Verunreinigung vorliegende Eisen aus der Rohnucleinsäure, so erhielten wir bei drei getrennt aufgearbeiteten Präparaten folgende Analysenzahlen:

- | | |
|---|---|
| 1. Präparat: N 15.67, P 9.01, P:N 1:1.74. | 3. Präparat: N 15.34, P 9.20, P:N 1:1.67. |
| 2. Präparat: N 15.86, P 9.27, P:N 1:1.71. | Ber.: N 16.77, P 9.89, P:N 1:1.70. |

Somit besitzt das 1. Präparat einen Reinheitsgrad (berechnet aus dem Mittel der N- und P-Werte) von 92.2%, das 2. einen solchen von 94.2%, das 3. von 92.4%. Ein großer Teil der Verunreinigungen besteht aus Kochsalz (4 $\frac{1}{2}$ %).

⁷⁾ Journ. Biochemistry **16**, 463 [1932].

⁸⁾ Journ. chem. Soc. London **1938**, 1492.

⁹⁾ Klein u. Rossi, Ztschr. physiol. Chem. **231**, 104 [1935].

Das Präparat 1 ergab bei der Titration eine Äquivalenzzahl von 4.6, umgerechnet auf 100-proz. Reinheit eine solche von 5.0. Die entspr. Zahlen für Präparat 2 waren 4.5 bzw. 4.8, für Präparat 3 4.6 bzw. 5.0.

Auf Grund der direkten Titration erwies sich somit die Thymonucleinsäure als 5-basische Säure. Um diesen Befund zu erhärten, haben wir den bei der Aufspaltung der Thymonucleinsäure entstehenden Aciditätszuwachs bestimmt. Bei der Totalaufspaltung in Nucleotide mußte sich eine Äquivalenzzahl von insgesamt 8 ergeben, d. h. ein Aciditätszuwachs von 3 Äquivalenten.

Bei der Widerstandsfähigkeit der Thymonucleinsäure gegenüber Alkali ließ sich eine milde chemische Aufspaltung nicht durchführen. Wir haben daher, entsprechend der Arbeitsweise von Makino⁶⁾, die fermentative Aufspaltung herangezogen. Von Makino wurde festgestellt, daß bei fermentativer Hydrolyse der Hefenucleinsäure mittels Dünndarmferments der Aciditätszuwachs, der durch Aufspaltung in die Nucleotide bedingt ist, etwa parallel der Phosphorsäure-Abspaltung verläuft, die durch die im Fermentpräparat enthaltene Nucleotidase hervorgerufen wird. Es sei hier bemerkt, daß durch die Phosphorsäure-Abspaltung kein gegenüber Phenolphthalein titrierbarer Aciditätszuwachs erfolgt. Man kann daher aus dem titrierten Aciditätszuwachs und der Menge abgespaltener Phosphorsäure auf den bei totaler Aufspaltung sich ergebenden Aciditätszuwachs schließen. Man darf annehmen, wie es auch Makino tut, daß ebenso wie bei der Hefe- auch bei der Thymo-nucleinsäure Aciditätszuwachs und Phosphorsäure-Abspaltung etwa parallel verlaufen, so daß man auch hier die gleichen Schlußfolgerungen hinsichtlich des Gesamtaciditätszuwachses ziehen kann. Bei unseren Versuchen ergab sich ein Gesamtaciditätszuwachs von a) 2.8 (Präparat 1), b) 2.9 Äquivalenten (Präparat 2). Auf 100-proz. Reinheit bezogen lauten die Werte a) 3.05, b) 3.1 Äquivalente.

Somit ist auf doppeltem Wege, einmal durch direkte Titration, zum anderen durch Bestimmung des Aciditätszuwachses bei der fermentativen Aufspaltung, festgestellt, daß die von uns benutzten Präparate der Thymonucleinsäure 5-basische Säuren sind. Dieses Ergebnis steht in bester Übereinstimmung mit entsprechenden Versuchen an der Thyminsäure (s. voranstehende Mitteil.). Auch die Thyminsäure hat sich als 5-basische Säure erwiesen. Damit scheidet für die Thymonucleinsäure die Anhydridformel II, ebenso die ringförmige Konstitution III aus. Es scheint uns nunmehr die Konstitution I als sicher bewiesen. Offen lassen möchten wir vorerst, ob auch die native Thymonucleinsäure als 5-basische Säure anzusprechen ist, oder ob hier vielleicht eine ringförmige Anordnung (III) anzunehmen ist. Im letzteren Fall müßte man bei der sicher nicht milden Art der Darstellung gewöhnlicher Thymonucleinsäure eine Aufspaltung des Ringes annehmen.

Wir sind schon seit längerer Zeit mit analogen Versuchen an verschiedenen Präparaten von Hefenucleinsäure beschäftigt. Hier ist ja durch die Fermentversuche von Takahashi⁷⁾ und Gulland⁸⁾ sowie durch die Titrationsversuche von Makino⁶⁾ der 4-basische Charakter und damit die ringförmige Anordnung (III) der Säure wahrscheinlich gemacht worden. Wir möchten jedoch jetzt schon darauf hinweisen, daß wir mit unseren Nucleinsäure-Präparaten nicht so klare Ergebnisse wie Makino erzielt haben. Wir werden demnächst darauf zurückkommen.

Für die Unterstützung der vorliegenden Untersuchungen danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Beschreibung der Versuche.

Titration der Thymonucleinsäure.

1) Rohe Thymonucleinsäure: Rohe Thymonucleinsäure wurde über Phosphor-pentoxyd bei 100°/2 mm zur Konstanz getrocknet, in Wasser aufgeschlämmt und mit n_{10} -NaOH gegen Phenolphthalein titriert:

0.6044 g verbr. 19.1 ccm n_{10} -NaOH \approx 4.0 Äquivalenten (ber. für $C_{30}H_{51}O_{25}N_{15}P_4$: 1253.4).

2) Gereinigte Thymonucleinsäure:

a) 4.305 mg Sbst.: 0.593 ccm N_2 (22°, 747 mm). — 0.1611 g Sbst.: 0.0521 g $Mg_2P_2O_7$. — 1.3477 g Sbst.: 0.0821 g Na_2SO_4 . — 19.580 mg Sbst.: 0.200 g AgCl.

Ber. N 16.77, P 9.89, P:N 1:1.70, Na —, Cl —

Gef. „ 15.67, „ 9.01, „ 1:1.74 „ 1.97, „ 2.53.

Somit besitzt das Präparat einen Reinheitsgrad von 92.2%. Es enthält als Verunreinigung 4.5% NaCl.

0.4302 g verbr. 15.9 ccm n_{10} -NaOH \approx 4.6 Äquiv. Auf einen Reinheitsgrad von 100% umgerechnet, ergibt sich eine Äquivalenzzahl von 5.0.

b) 4.890 mg Sbst.: 0.671 ccm N_2 (20°, 754 mm). — 0.1576 g Sbst.: 0.0524 g $Mg_2P_2O_7$.

Ber. N 16.77, P 9.89, P:N 1:1.70. Gef. N 15.86, P 9.27, P:N 1:1.71.

Somit besitzt das Präparat einen Reinheitsgrad von 94.2%.

0.5779 g verbr. 20.6 ccm n_{10} -NaOH \approx 4.5 Äquiv. Auf einen Reinheitsgrad von 100% umgerechnet, ergibt sich eine Äquivalenzzahl von 4.8.

c) 4.010 mg Sbst.: 0.536 ccm N (19°, 749 mm). — 0.1688 g Sbst.: 0.0556 g $Mg_2P_2O_7$.

Ber. N 16.77, P 9.89, P:N 1:1.70. Gef. N 15.34, P 9.20, P:N 1:1.67.

Somit besitzt das Präparat einen Reinheitsgrad von 92.4%.

0.4370 g verbr. 16.1 ccm n_{10} -NaOH \approx 4.6 Äquiv. Auf einen Reinheitsgrad von 100% umgerechnet, ergibt sich eine Äquivalenzzahl von 5.0.

Bestimmung des Aciditätszuwachses durch fermentative Hydrolyse.

a) 1.5411 g des Präparates 2a (Reinheitsgrad 92.2%) wurden mit n_{10} -NaOH neutralisiert, mit 20 ccm gleichfalls gegen Phenolphthalein neutralisierter Dünndarm-ferment-Lösung (hergestellt nach Klein¹⁰) versetzt, auf 150 ccm mit Wasser aufgefüllt und 72 Stdn. bei 37° aufbewahrt. Nach dieser Zeit wurde wiederum mit n_{10} -NaOH neutralisiert, wobei 11.1 ccm verbraucht wurden. Da in einem entsprechend durchgeführten Kontrollversuch ohne Substrat 0.7 ccm bei der Neutralisation verbraucht wurden, ergibt sich für den Hauptversuch mithin ein Aciditätszuwachs von 10.4 ccm.

Die neutralisierte Lösung wurde mit 15 ccm 20-proz. Trichloressigsäure enteiweißt, im Filtrat die abgespaltene Phosphorsäure mit Magnesiamixtur gefällt und als Magnesiumpyrophosphat zur Wägung gebracht. Entsprechend wurde der Kontrollansatz aufgearbeitet.

Hauptversuch: 0.1802 g $Mg_2P_2O_7$. Kontrollversuch: 0.0153 g $Mg_2P_2O_7$.

Es verbleiben somit für die Spaltung des Substrats 0.1649 g $Mg_2P_2O_7$, entspr. 0.0459 g P. Diese abgespaltene Menge P entspricht 30.2% des Gesamt-P-Gehaltes.

Der Aciditätszuwachs von 10.4 ccm entspr. einer 30.2-proz. Aufspaltung. Somit entspr. einer 100-proz. Aufspaltung 34.4 ccm n_{10} -NaOH, entspr. 2.8 Äquiv. (bei 92.2% Reinheit). Umgerechnet auf 100-proz. Reinheit ergibt sich ein Aciditätszuwachs entspr. 3.05 Äquivalenten.

¹⁰) Ztschr. physiol. Chem. **207**, 125 [1932].

b) Mit 0.5779 g des Präparates 2b (Reinheitsgrad 94.2%) wurde die analoge Fermentenspaltung durchgeführt. Die neutralisierte Lösung wurde mit 15 ccm neutralisierter Fermentlösung versetzt, auf 150 ccm mit Wasser aufgefüllt und 48 Stdn. aufbewahrt. Danach wurden 4.5 ccm $n/_{10}$ -NaOH zur Neutralisation verbraucht. Da auf den Kontrollansatz 0.5 ccm entfallen, verbleiben 4.0 ccm.

Die Bestimmung des abgespaltenen Phosphors ergab:

Hauptversuch: 0.0708 g $Mg_2P_2O_7$. Kontrollversuch: 0.0101 g $Mg_2P_2O_7$.

Es verbleiben somit für die Spaltung des Substrats 0.0607 g $Mg_2P_2O_7$, entspr. 0.0169 g P. Diese Menge entspr. 29.6% des Gesamt-P-Gehaltes.

Bei der wie unter a vorgenommenen Berechnung ergibt sich, umgerechnet auf 100-proz. Reinheit, ein Aciditätszuwachs entspr. 3.1 Äquivalenten.

26. Karl Heinrich Slotta und Klaus Neisser: Zur Chemie des Kaffees, V. Mittel.: Neuere analytische Erfahrungen.

[Aus d. Forschungsabteil. d. Kaffee-Instituts, S. Paulo, Instituto Butantan.]

(Eingegangen am 22. Dezember 1938.)

1) Über die Zusammensetzung des Rohkaffees.

Die Zusammensetzung des Kaffees interessierte uns nicht nur vom chemischen und physiologischen Gesichtspunkt aus, sondern auch, um die Frage beantworten zu können, ob und wozu der riesige Kaffee-Überschuß Brasiliens von jährlich mehreren Millionen Sack möglicherweise technisch verwertbar wäre. Die chemische Zusammensetzung ist bis in die letzten Einzelheiten durchaus noch nicht bekannt¹⁾. Die durchschnittliche Summe der im Schrifttum angegebenen Werte kommt nur auf 87%. Überdies sind darin Werte für manche recht unscharf umrissene Stoffgruppen inbegriffen, die unbedingt noch einer genaueren Aufteilung bedürfen. Wir haben deshalb eine möglichst genaue und weitgehend unterteilte Gesamtanalyse eines brasilianischen Kaffees durchgeführt und stellen im folgenden unsere Werte den durchschnittlichen Werten des Schrifttums gegenüber.

Die meisten unserer Werte haben wir nach der Methode zur Analyse von Pflanzenmaterial von S. A. Waksman und K. R. Stevens²⁾ gewonnen, die wir jedoch in manchen Punkten unseren Zwecken entsprechend abgeändert haben. Wir beschreiben die genauen Einzelheiten im Versuchsteil. Der Wassergehalt wurde durch Trocknen bei 100°, der Fettgehalt durch Extraktion mit Petroläther ermittelt. Die dann folgende Gruppe von Substanzen, mit Ausnahme des SiO_2 , bis zu den „weiteren wasserlöslichen Stoffen“, findet sich in dem Heißwasser-Extrakt (wir verzichteten gegenüber der Originalvorschrift auf eine Trennung in Kaltwasser- und Heißwasser-Extrakt). Durch Eindampfen findet man sein Gesamtgewicht und durch Veraschen den Betrag an wasserlöslicher Asche. Die Werte von Coffein, Trigonellin, reduzierendem Zucker, Chlorogensäure und Kaffeesäure sind in gesonderten Analysen nach

¹⁾ Handb. d. Lebensmittelchemie VI, S. 7.

²⁾ Ind. engin. Chem., Analyt. Edit. 2, 167 [1930]. Zitiert im Handb. der Pflanzenanalyse III, 1, 532.