Lichenase-Extraktion aus Gerste

Von JOACHIM GOERDELER

Aus dem Chemischen Institut der Universität Bonn

(Z. Naturforschg. **3b**, 403—406 [1948]; eingegangen am 29. November 1948)

Nach älteren Beobachtungen kann man aus einer Gerstenprobe mehr Amylase gewinnen, wenn man dem Extraktionswasser Papain oder andere Proteinaseen zusetzt. Dieses führte K. Myrbäck auf proteolytische Ablösung eines gebundenen Amylaseanteiles zurück. Um zu klären, ob ähnliche Verhältnisse für die Gersten-Lichenase gelten, wurde zunächst mit dest. Wasser bei 10° und 30° extrahiert, wobei festgestellt wurde, daß die Temperaturänderung den Lichenasegehalt der wäßrigen Lösung nicht beeinflusst; er erreicht schon nach etwa 3 Stdn. seinen Höchstwert, ohne Rühren (bei gelegentlichem Schütteln) nach spätestens 6 Stdn. Längeres Rühren läßt auch bei Gegenwart von Toluol keine Inaktivierung des Fermentes erkennen. Zusätze von Schwefelwasserstoff, Papain sowie einer Mischung beider bewirken keine Änderung der Lichenasekonzentration (bzw. -aktivität). Damit ist festgestellt, daß für die Lichenase in der Gerste andere Bindungsverhältnisse bestehen als für die Amylase, und daß Papain das (vermutliche) Proteid Lichenase nicht abbaut. — Die Verhältnisse bei der Keimung werden kurz gestreift.

Im Jahre 1908 beobachteten Ford und Guthrie¹, daß die Menge der Amylase, die man aus Gerste mit Wasser extrahieren kann, vergrößert wird, wenn man der Lösung Papain zusetzt. Weitere Versuche in der Richtung stammen u. a. von Chrząszcz². Er stellte fest, daß außer Papain auch andere Stoffe wie Trypsin, Labferment, Pepton und auch Schwefelwasserstoff denselben Effekt bewirken. Als Erklärung nahm Chrząszcz an, daß die Vermehrung der aktiven Amylase „durch Mobilisierung oder Freiwerden von im Getreide sich befindenden Amylaseaktivatoren“ erfolge³. Nach K. Myrbäck⁴ ist jedoch die Freilegung der Amylase durch Papain usw. ausschließlich eine Proteolyse. Die Schwefelwasserstoff- und Peptonwirkung wird durch Beseitigung von hemmenden Kupferionen verursacht⁵. In der Gerste befindet sich nach Myrbäcks Annahme wirksame und gebundene inaktive Amylase. Erstere geht mit Wasser in Lösung, die zweite wird durch geeignete Stoffe, wie Proteinaseen, freigemacht, wobei sie aktiv wird. Über eine Papainwirkung ähnlicher Art berichteten früher Willstätter und Graßmann⁶.

Die Tätigkeit gewisser Fermente vergrößert also den Amylasegehalt. Man hat in diesem Zusammenhang von „künstlicher Keimung“ gesprochen, denn bei der Keimung wird ja ebenfalls das Stärke abbauende Ferment vermehrt. Aber hier bestehen doch qualitative Unterschiede, worauf Myrbäck hinwies⁴. Die Papainwirkung vergrößert nur den verzuckernden Teil des Amylasekomplexes (die sog. β -Amylase), während die Keimung mehr durch starken Anstieg der α -Amylase charakterisiert ist. Immerhin dürften proteolytische Vorgänge mit im Spiel sein.

Auf diese interessanten Fragen könnte weiteres Licht geworfen werden durch Untersuchung anderer Gerstenfermente, insbesondere von solchen, deren Gesamtsystem weniger kompliziert ist als das der Amylasen. Als solches erschien die *Lichenase*, ein Ferment, dessen Vorhandensein in Cerealien schon Karrer⁷ und Pringsheim⁸ festgestellt hatten, geeignet. Nach den Vorstellungen dieser Forscher baut die Lichenase β -glykosidisch aufgebaute Polysaccharide bis zu niedrigmolekularen Oligosacchariden ab, die dann von anderen Fermenten weiter zerlegt werden. Es tauchte also die Frage auf, ob auch dieses

¹ Ford u. Guthrie, J. Inst. Brewing **14**, 61 [1908], zit. nach Baker u. Hulton, J. chem. Soc. [London] **121**, 1929 [1922].

² z. B. Chrząszcz u. Janicki, Biochem. Z. **272**, 402 [1934].

³ Chrząszcz u. Janicki, Biochem. Z. **285**, 47 [1936].

⁴ K. Myrbäck u. S. Myrbäck, Biochem. Z. **285**, 282 [1936].

⁵ Myrbäck u. Oertenblad, Enzymologia [Den Haag] **9**, 43 [1940]; Chem. Zbl. **1941** I, 3233.

⁶ Willstätter u. Graßmann, Biochem. Z. **203**, 308 [1928].

⁷ Karrer, Staub, Weinhausen u. Joos, Helv. chim. Acta **7**, 144 [1924].

⁸ Pringsheim u. Seifert, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **128**, 284 [1923].

Ferment, ähnlich wie sein α -glykosidischer Gefährte, von Bedingungen oder Stoffen, die eine Eiweißspaltung verursachen, in Richtung auf eine Änderung der Menge (oder Aktivität) beeinflusst wird.

Für die experimentelle Beantwortung wurde nach folgenden Richtlinien vorgegangen:

Um von Versuchsreihe zu Versuchsreihe vergleichbare Werte zu erhalten und von kinetischen Voraussetzungen frei zu bleiben, wurde hinsichtlich Konzentration, Substrat und Spaltungsbedingungen stets gleichmäßig gearbeitet. Daher ergeben die Prozentzahlen der Spaltung unmittelbar Vergleichsmöglichkeiten. Änderungen von rd. 100 %, wie sie bei der Amylase beobachtet wurden⁹, mußten deutlich erkennbar sein. Da es sich nicht vermeiden läßt, daß bei der Extraktion eine große Menge reduzierender Begleitstoffe, die bei der Bestimmung stören würden, mit in Lösung gehen, mußten die Extrakte zunächst dialysiert werden. Die erhaltenen Flüssigkeiten wurden dann mit kolloidaler Licheninlösung vereinigt und der durch die Fermenteinwirkung neuentstandene Zucker als Glucose quantitativ bestimmt. Aus den Spaltprozenten ließ sich auf die relativen Mengen des in Lösung gegangenen Fermentes schließen.

In einem ersten Versuch sollten fermentative Einflüsse der gersteneigenen Proteinase, die seit langem bekannt sind¹⁰, möglichst unterdrückt werden. Es sollte ferner festgestellt werden, welche Zeit für eine erschöpfende Extraktion benötigt wird. Hierzu wurde die Gerste bei 10° mit Wasser unter mechanischer Rührung ausgelaugt. In gewissen Zeitabständen wurden Proben entnommen und nach Vorbehandlung auf Lichenase geprüft. Es zeigte sich, daß nach etwa 3 Stdn. Extraktionszeit der Lichenasegehalt praktisch nicht mehr ansteigt, schon nach 1/2 Stde. ist er beträchtlich.

Nicht anders ist das Ergebnis bei 30°. Auch hier wird ein Maximalwert erreicht, der sich mit dem von 10° ungefähr deckt. Auch die Extraktionszeit ist kaum verändert. Die höhere Temperatur läßt also keine Tätigkeit der Gerstenproteinase im Hinblick auf eventuelle Lichenaseablösung erkennen.

⁹ Chrzaszcz u. Janicki, *Biochem. Z.* **281**, 408 [1935].

¹⁰ Lüers u. Malsch, *Wschr. Brauerei* **46**, 265 [1929]; *Chem. Zbl.* **1930** I, 398.

¹¹ Holmbergh, *Svensk kem. Tidskr.* **49**, 252 [1937]; *Chem. Zbl.* **1938** I, 1800.

Ein Nebenversuch zeigte, daß auch gelegentliches Umschütteln genügt, um in relativ kurzer Zeit (höchstens 6 Stdn.) vollständiges Herauslösen der Polyase zu bewirken. Er bewies ferner, daß das mechanische Rühren auch in Gegenwart von Toluol keine Schwächung der Lichenase verursacht im Sinne einer Schüttelinaktivierung, wie sie Holmbergh¹¹ bei der Amylase feststellte.

Weitere Aktivierung der Proteinase wurde durch Schwefelwasserstoff, der für solche Zwecke mehrfach erwähnt wird¹², versucht. Als auch hier keine Steigerung eintrat, wurde schließlich durch Zusatz fremder Proteinase — gewöhnliches und mit Schwefelwasserstoff aktiviertes Papain — die Ablösungsmöglichkeit verstärkt. Aber hier wie in den vorhergehenden Ansätzen zeigte sich keine Einwirkung, die Spaltprozente waren nicht höher als bei dem zusatzlosen 10°-Versuch. (Allerdings auch nicht geringer, ein Zeichen dafür, daß die fremde Proteinase die Lichenase, die vermutlich Proteidnatur hat, an entscheidenden Stellen nicht angreift.)

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Verhältnisse bei der Lichenase anders liegen als bei der Amylase. Entweder gibt es hier gar keinen wasserunlöslichen Anteil, oder dieser ist in anderer Art befestigt, so daß er nicht proteolytisch abgelöst werden kann. Es fragt sich, ob diese Erscheinung in einem Zusammenhang steht mit der (im Vergleich zur Amylase) nur geringen Steigerung der Aktivität der Lichenase bei der Keimung, die zuerst Karrer¹³ festgestellt hatte.

Beschreibung der Versuche

Die Versuchsanordnung war in allen Fällen gleichartig: die gemahlene und gewogene Gerste (Ernte 1947) wurde mit der 4-fachen Menge Wasser¹⁴ und einigen Tropfen Toluol sowie gegebenenfalls weiteren Zusätzen bei bestimmten Temperaturen mechanisch gerührt. Ein einfacher, rechteckig gebogener Glasstab durchmischte hierbei den Gefäßinhalt mit mäßiger Geschwindigkeit. Das Gefäß war mit Gummistopfen verschlossen, der Rührer lief eingeschliffen in einer KPG-Hülse. Ein besonderer Versuch überzeugte, daß bei dieser Anordnung keine Verdunstungsverluste eintraten. In gewissen Zeitabständen wurden möglichst gleichartige Proben (d. h. in etwa gleichem Mischungsverhältnis fest-flüssig wie in der Mutterflüssigkeit) von etwa 20 cm³ entnommen und

¹² Bamann u. Myrbäck, *Die Methoden der Fermentforschung*, Georg Thieme, Leipzig 1941, S. 2059.

¹³ Karrer u. Staub, *Helv. chim. Acta* **7**, 916 [1924].

¹⁴ In allen Versuchen wurde mit dest. Wasser gearbeitet.

ohne Konzentrationsänderung durch Faltenfilter filtriert. Hiervon pipettierte man bestimmte Mengen (3 bzw. 4 cm³) in kleine, selbstgefertigte Dialysierhülsen aus Kollodium (die bis zu 3-mal verwendet werden konnten). Mechanisch bewegtes Wasser diente bei der Dialyse als Außenflüssigkeit. Nach 8 Stdn. waren die Proben bei neuen Hülsen stets vollkommen frei von reduzierenden Bestandteilen (Fehlingsche Lösung), bei schon gebrauchten Membranen ließen sich noch geringe Mengen nachweisen, die aber im weiteren Verlauf nicht störten. Die Inhalte der Hülsen — es war im Verlauf der Dialyse gewöhnlich eine Vermehrung um etwa 30% eingetreten — wurden quantitativ unter Nachspülung mit Wasser in ein graduiertes Gefäß pipettiert und auf 6 bzw. 8 cm³ mit Wasser aufgefüllt; sie dienten, unter Toluol im Eisschrank aufbewahrt, zur Prüfung auf Fermentwirkung.

Für die fermentativen Spaltungen wurde als Substrat *Lichenin* benutzt, das aus isländischem Moos nach Heß¹⁵ hergestellt worden war. Durch Erwärmung mit Wasser wurde eine 0,5-proz. Lösung hergestellt. Nach Dekantieren diente diese leicht bräunliche, trübe Flüssigkeit, mit etwas Toluol versehen, als Vorratslösung.

Alle Spaltgemische wurden durch Vereinigen von je 1 cm³ Fermentlösung, *m*/10-Acetat-Puffer (*p*_H 5,0) und Licheninlösung hergestellt. Blindproben mit Wasser statt Lichenin bzw. statt Ferment entsprechend.

Die Ansätze wurden, mit einigen Tropfen Toluol sterilisiert, im Thermostaten bei 30° aufbewahrt (gewöhnlich 3 Tage). Danach wurde der Inhalt der Gläschen quantitativ in 100-cm³-Erlenmeyer-Kolben übergeführt und nach der von Dumazert¹⁶ ausgearbeiteten Halbmikromethode des Willstätter-Schudel-Verfahrens mit Jodlösung (etwa *n*/20) und Thiosulfat (etwa *n*/40) aus der Mikrobürette titriert. Der Jodverbrauch wurde als Glucose gerechnet (die starke Cellobiase der Gerste läßt dieses gerechtfertigt erscheinen). Der Titer der Lösungen war mit reiner Glucose bestimmt worden. Blindversuche zeigten, daß die Toluoltröpfchen die Titration nicht beeinflussen. Sowohl Lichenin allein, wie auch die reinen Fermentlösungen zeigten stets einen gewissen Jodverbrauch (in letzterem Fall stark abhängig von dem Erfolg der Dialyse).

Zur Berechnung der Spaltprozente wurde der theoretische Endwert (für 100-proz. Spaltung also) = 5,55 mg Glucose benutzt. Eine Titration nach Säure-Hydrolyse ergab als Mittel 5,10 mg. Da aber nach Pringsheim⁸ bei diesem Verfahren mit einigen Verlusten zu rechnen ist, wurde der theoretische Wert als der richtigere angesehen.

1. Extraktion bei 10° (*p*_H 5,5–5,7)

Spaltzeit bei Versuch 1 und 2 72, bei 3 86 Stdn.; die Werte von 3 sind nur unter sich brauchbar, da der Thermostat während des Versuches zeitweilig nicht einwandfrei arbeitete.

¹⁵ Heß u. Lauridsen, Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 121 [1940].

Vers.-Nr.	Extr.-zeit (Stdn.)	cm ³ Thiosulfat			mg Glucose	% Spaltg.
		Ferment allein	Ferment + Lichenin	Differenz		
1	0,25	0,204	0,519	0,239	0,51	9
1	0,50	0,358	0,741	0,307	0,65	12
1	1,0	0,440	1,001	0,485	1,03	19
1	3,2	0,669	1,136	0,391	0,83	15
1	23	0,450	0,981	0,455	0,97	18
2	1,0	0,377	0,735	0,276	0,63	11
2	3,25	0,379	0,938	0,477	1,09	20
2	11	0,268	0,860	0,510	1,17	21
2	24	0,333	0,957	0,542	1,24	22
3	0,6	0,300	0,813	0,346	0,73	13
3	1,6	0,433	1,035	0,435	0,92	17
3	2,6	0,412	1,078	0,499	1,06	19
3	24	0,449	1,121	0,505	1,07	19

Die Eigenwerte für Lichenin sind berücksichtigt. 0,001 cm³ Thiosulfat = 0,00212 mg Glucose (Vers. 1 und 3) bzw. 0,00229 mg Glucose (Vers. 2).

2. Extraktion bei 30° (*p*_H 5,3–5,4)

Spaltzeit 70 Stdn.

Vers.-Nr.	Extr.-zeit (Stdn.)	cm ³ Thiosulfat			mg Glucose	% Spaltg.
		Ferment allein	Ferment + Lichenin	Differenz		
4	2	0,592	1,195	0,444	0,94	17
4	6	0,614	1,261	0,488	1,04	19
4	12	0,526	1,243	0,558	1,18	21
5	2	0,687	1,213	0,367	0,78	14
5	6	0,774	1,412	0,479	1,02	18
5	11	0,770	1,384	0,525	1,11	20

Die Eigenwerte für Lichenin sind berücksichtigt. 0,001 cm³ Thiosulfat = 0,00212 mg Glucose.

3. Extraktion ohne Rühren (30°, *p*_H 5,5–5,6)

Die Gerste wurde mit Wasser, wie üblich, versetzt. Das Gemisch wurde ohne zu rühren, jedoch mit gelegentlichem Schütteln, im Thermostaten von 30° mit Toluol aufbewahrt.

Spaltzeit 72 Stdn.

Vers.-Nr.	Extr.-zeit (Stdn.)	cm ³ Thiosulfat			mg Glucose	% Spaltg.
		Ferment allein	Ferment + Lichenin	Differenz		
6	6	0,373	0,989	0,524	1,20	22
6	24	0,240	0,901	0,569	1,30	23

Die Eigenwerte für Lichenin sind berücksichtigt. 0,001 cm³ Thiosulfat = 0,00229 mg Glucose.

¹⁶ Dumazert, Bull. Soc. Chim. biol. 16, 932 [1934].

4. Extraktion mit schwefelwasserstoffhaltigem Wasser (30°)

Die Extraktionsflüssigkeit wurde durch längeres Einleiten von gewaschenem Schwefelwasserstoff in Wasser hergestellt. p_H 5,0 (Lyphan). 80 cm³ hiervon wurden, wie üblich, mit 20 g Gerste angesetzt. Die filtrierten Lösungen rochen nicht mehr nach Schwefelwasserstoff, p_H 5,1–5,4. Während der Dialyse trat starkes Ausflocken ein. Spaltzeit 72 Stdn.

Vers.-Nr.	Extr.-zeit (Stdn.)	cm ³ Thiosulfat			mg Glucose	% Spaltg.
		Ferment allein	Ferment + Lichenin	Differenz		
7	2	1,628	2,084	0,330	0,73	13
7	6	1,668	2,142	0,348	0,77	14
7	11	1,340	1,846	0,380	0,84	15
8	2	1,072	1,619	0,421	0,93	17
8	6	1,352	1,900	0,422	0,94	17
8	11	1,443	2,087	0,518	1,15	21

Die Eigenwerte für Lichenin sind berücksichtigt. 0,001 cm³ Thiosulfat = 0,00222 mg Glucose.

5. Extraktion mit Papainlösung (30°)

0,85 g käufliches Papain wurden mit 25 cm³ Wasser anteilweise verrieben. Nach 1 Stde. wurde filtriert, einmal mit Wasser nachgewaschen, das Ganze auf 85 cm³ aufgefüllt. Hiermit extrahierte man, wie üblich, die Gerste (p_H 5,3). Spaltzeit 72 Stdn.

Vers.-Nr.	Extr.-zeit (Stdn.)	cm ³ Thiosulfat			mg Glucose	% Spaltg.
		Ferment allein	Ferment + Lichenin	Differenz		
9	6	0,701	1,447	0,585	1,34	24
9	11	0,772	1,425	0,492	1,13	20
10	6	0,728	1,415	0,526	1,21	22
10	11	0,875	1,576	0,540	1,24	22

Die Eigenwerte für Lichenin sind berücksichtigt. 0,001 cm³ Thiosulfat = 0,00229 mg Glucose.

6. Extraktion mit Schwefelwasserstoff-Papain-Lösung (30°)

0,5 g Papain wurden mit 15 cm³ Wasser verrieben, nach 1 Stde. filtriert, auf 50 cm³ aufgefüllt. Ein gewaschener Schwefelwasserstoff-Strom perlte 1 Stde. durch diese Lösung, mit der anschließend die Gerste im üblichen Mengenverhältnis extrahiert wurde (p_H 5,2 bis 5,3).

Spaltzeit 72 Stdn.

Vers.-Nr.	Extr.-zeit (Stdn.)	cm ³ Thiosulfat			mg Glucose	% Spaltg.
		Ferment allein	Ferment + Lichenin	Differenz		
11	11	1,184	1,732	0,456	1,05	19
12	11	0,973	1,628	0,563	1,29	23

Die Eigenwerte für Lichenin sind berücksichtigt. 0,001 cm³ Thiosulfat = 0,00229 mg Glucose.

7. Prüfung der Proteinase-Wirkung des Papains

Zum Versuch diente a) die Papain-Schwefelwasserstoff-Lösung wie in 6., b) eine warme Lösung von 2 g Gelatine in 10 cm³ m/10-Acetat-Puffer (p_H 5,0). Bei den Ansätzen wurden je 2 cm³ a) mit 1 cm³ b) gemischt und die angegebene Zeit bei 40° aufbewahrt. Titration nach Willstätter¹⁷ in 90-proz. Alkohol mit etwa n/10-alkohol. Kalilauge gegen Thymolphthalein.

Spaltzeit (Stdn.)	0	4	21*
Verbrauch cm ³ KOH	3,98	8,50	9,25.

* 9 Stdn. bei 40°, 12 Stdn. bei 30°.

¹⁷ Willstätter u. Waldschmidt-Leitz, Ber. dtsch. chem. Ges. **54**, 2988 [1921]; Willstätter u. Graßmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **138**, 184 [1924].

Zur quantitativen Mikrobestimmung von Desoxy- und Ribonucleinsäure

Von GERNOT BERGOLD und LISELOTTE PISTER

Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie, Abteilung Virusforschung, Tübingen
(Z. Naturforsch. **3b**, 406–410 [1948]; eingegangen am 23. September 1948)

Es wird über gute Erfahrungen mit der quantitativen Mikrobestimmung von Desoxynucleinsäure nach Seibert berichtet und eine neue spezifische Methode der quantitativen Mikrobestimmung von 10–120 γ Ribonucleinsäure beschrieben. Die Methode ermöglicht eine verlustfreie Hydrolyse und Umsetzung der Pentose zu Furfurol. Das Furfurol wird aus dem Hydrolysat mit Chloroform ausgeschüttelt und mit Anilin kolorimetrisch bestimmt.

Die Forschungen der letzten Jahre weisen darauf hin, daß den Nucleinsäuren eine fundamentale Bedeutung bei allen biologischen Vermeh-

rungsvorgängen zukommt. Überall in einem Organismus, wo Teilungsvorgänge stattfinden, sind Nucleinsäuren in angereicherter Menge vorhan-

den, und alle bisher bekannten Virusarten enthalten Nucleinsäure. Quantitative Bestimmungsmethoden der Nucleinsäure sind daher von großem Interesse. Da oft, vor allem in der Virusforschung, nur geringe Substanzmengen zur Verfügung stehen, sind Mikromethoden besonders erwünscht. Während für die Desoxynucleinsäure (DNS) eine Mikromethode vorliegt¹, bereitete bisher die streng spezifische, quantitative Mikrobestimmung der Ribonucleinsäure (RNS) große Schwierigkeiten. Nach kurzem Eingehen auf die von Seibert ausgearbeitete Mikromethode der DNS-Bestimmung wird im folgenden eine neue Mikrobestimmungsmethode für die RNS beschrieben.

Die Bestimmung der Desoxynucleinsäure

Von Dische² wurde bereits 1930 Diphenylamin als spezifisches Reagens für DNS angegeben. Diese Methode, die empfindlicher als die Feulgen-Reaktion ist, wurde etwa gleichzeitig von Vowles³ und Seibert⁴ zu einer quantitativen Mikromethode ausgearbeitet. Die Methode von Seibert wird z. B. von Dounce⁵ mit Erfolg verwendet. Eigene Versuche nach der untenstehenden Vorschrift haben ebenfalls die Brauchbarkeit dieser Methode bestätigt. Die Blaufärbung wurde unter Verwendung des Kombinationsfilters von Schott OG 2—VG 3 (600 m μ) im Photometer nach Kortüm⁵ in 5-cm³-Mikro-Küvetten (Schichtdicke 2,5 cm) gemessen. Sie entsteht rasch, etwa innerhalb von 10 Min., nimmt bis etwa 30 Min. nur noch wenig zu und fällt dann langsam ab. Verwendet wird jeweils der höchste Extinktionswert etwa 25—30 Min. nach Hinzufügen des Blank- bzw. Dische-Reagenses. Trotz der hohen Empfindlichkeit der Reaktion (etwa 40 γ) gegen DNS ergaben 500 γ RNS keinerlei Farbreaktion. Dies bestätigt die hohe Spezifität des Diphenylamins. Ferner wurde geprüft, ob die Gegenwart von größeren Eiweißmengen den Extinktionswert verändert, wie dies vom Arbeitskreis um Euler⁶⁻⁸ angegeben wird. Es ergab sich jedoch, daß 1,6 mg kristalli-

siertes Pferdeserumalbumin die Extinktion eines 40- γ -DNS-Wertes nicht verändert. In diesem Zusammenhang soll betont werden, daß die hier beschriebenen Methoden vor allem für weitgehend gereinigte Substanzen gedacht sind, die nur in geringer Menge zur Verfügung stehen.

Abb. 1 läßt den geradlinigen Verlauf der Eichkurve erkennen. Hierbei wurde die Extinktion (Trommelstrich am Photometer) der Eichwerte auf den experimentell bestimmten P-Gehalt der DNS bezogen und aus der theoretischen Beziehung $\text{DNS/P} = 10,11$ die Menge DNS berechnet. Mit dieser Methode ließ sich zeigen, daß bei Polyederviren der gesamte vorhandene Phosphor in DNS-Bindung vorliegt.

Abb. 1. Desoxynucleinsäure-Eichwerte.

Ausführung der Desoxynucleinsäure-Bestimmung

Reagenzien: Schwefelsäure konz. p.a., N-frei, spez. Gew. 1,835,

Diphenylamin p.a.,

Eisessig 99—100% puriss. oder p.a.,

Standardlösung: Desoxynucleinsäure (Schuchardt), etwa 0,01%.

Dische-Reagens: 1,5 cm³ Schwefelsäure konz. + 1,0 g Diphenylamin + 100 cm³ Eisessig.

Blank-Reagens: 1,5 cm³ Schwefelsäure konz. + 100 cm³ Eisessig.

Ausführung: Pipettiere je 0,5 cm³ der Versuchslösung (mindestens je 20 γ Nucleinsäuregehalt) in 2 Reagensröhrchen. Füge zu dem einen Röhrchen (A) 1 cm³ Dische-, und zu dem anderen Röhrchen (B) 1 cm³ Blank-Reagens. Tauche die Röhrchen sofort 10 Min. in kochendes Wasser und kühle diese anschließend 10 Min. in fließendem Wasser. Füge zu Röhrchen A 4,5 cm³ Blank-Reagens und zu Röhrchen B 1 cm³

⁶ L. Ahlström, H. v. Euler, I. Fischer, L. Hahn u. B. Hogberg, Ark. Kem., Mineral. Geol., Ser. A 20, Nr. 15 [1945].

⁷ L. Ahlström, L. Euler u. L. Hahn, Ark. Kem., Mineral. Geol., Ser. A 22, Nr. 13 [1946].

⁸ W. Solodkowska u. Euler, Svensk kem. Tidskr. 58, 116 [1946].

¹ F. B. Seibert, J. biol. Chemistry 133, 593 [1940].

² Dische, Mikrochem. 8, 4 [1930].

³ Vowles, Ark. Kem., Mineral. Geol., Ser. B 14, Nr. 10 [1940].

⁴ A. L. Dounce, J. biol. Chemistry 151, 221 [1943].

⁵ G. Kortüm, Chem. Technik 15, 167 [1942]; s. auch G. Bergold u. L. Pister, Zur Mikrobestimmung von 0,1—7 γ P in organischem Material, Z. Naturforschg. 3b, 332 [1948].

Dische- und 3,5 cm³ Blank-Reagens. Die Gesamtflüssigkeit beider Röhrchen beträgt 6,0 cm³. Fülle die Lösungen in je eine 5-cm³-Küvette (Schichtdicke 2,5 cm) und bestimme die Extinktion im Kortüm-Photometer mit Schott-Filter OG 2—VG 3 (600 mμ) sofort und laufend, bis der Extinktionswert schwach abfällt (etwa 40 Min. nach Hinzufügung des Dische- bzw. Blank-Reagenses). Verwende den höchsten Extinktionswert. Nach Berücksichtigung der Trogdifferenz (beide Küvetten mit Wasser gefüllt) ziehe den Extinktionswert der Probe B von Probe A ab. Der Extinktionswert des Blank-Wertes (B) beträgt bei farblosen Eiweiß- und DNS-Lösungen etwa 50—100 Trommelstriche.

Die Bestimmung der Ribonucleinsäure

Die Bestimmung der RNS durch Umsetzung der Pentose zu Furfurol, Destillation desselben und anschließende Kolorimetrierung nach Zugabe von Anilin, wurde zuerst von Hoffmann⁹ beschrieben. Der Weg über das Furfurol hat den Vorteil, streng spezifisch zu sein. Leider ist jedoch die restlose Hydrolyse sowie die Destillation und Umsetzung des Furfurols experimentell schlecht reproduzierbar. Dies gilt besonders, wenn geringe Substanzmengen bestimmt werden sollen. Die Möglichkeit der Zerstörung des Furfurols bei der Salzsäurehydrolyse versuchte Jayme¹⁰ durch Verwendung von Bromwasserstoff an Stelle der Salzsäure zu umgehen.

In zahlreichen eigenen Versuchen konnten jedoch die Ergebnisse von Jayme bei Verwendung von reinstem Furfurol als Testsubstanz und reiner Bromwasserstoffsäure nicht bestätigt werden. Trotz genauester Einhaltung der von ihm geforderten Temperatur von 104°C durch elektrischer Regulierung wurde immer ein beträchtlicher Teil des Furfurols zerstört. Dies war jedoch in geringerem Maße der Fall, wenn nicht reines Furfurol, sondern z. B. Nucleinsäure oder anderes organisches pentosehaltiges Material aufgeschlossen wurde. Die Destillation von einigen γ Furfurol stieß aber immer auf größte experimentelle Schwierigkeiten, wenn man trotz der notwendigen langen Aufschlußzeit geringe Destillatmengen zur Mikrobestimmung haben wollte.

Es wurde daher der von Fulmer und Mitarbb.¹¹ angedeutete Weg der Überführung des Furfurols aus dem Hydrolysat in ein Lösungsmittel ver-

sucht.* Hierbei wurden zuerst ohne Hydrolyse die Bedingungen der Ausschüttelung von zugesetztem reinstem Furfurol untersucht. Von den zahlreichen geprüften Lösungsmitteln erwies sich Chloroform als am besten geeignet.

Die restlose Freisetzung und Umsetzung der Pentose zu Furfurol ohne Verluste erschien zuerst aussichtslos, da mindestens 104°C zur Hydrolyse notwendig sind, aber andererseits bereits bei dieser Temperatur, auch in einem relativ großen Rundkolben, ein Teil des Furfurols zer-

Abb. 2. Hydrolyse-Apparatur.

stört wird. Schließlich wurde die aus Abb. 2 ersichtliche Anordnung gefunden, bei welcher nur ein zylindrischer Ansatz in das elektrisch regulierte Glycerinbad eintaucht, und der darüber befindliche große Gasraum durch eine Asbestplatte möglichst vor Wärme geschützt wird. In diesem kühlen Raum bleibt das gebildete Furfurol während der ganzen Dauer der Hydrolyse unzerstört. Ein geringer Zusatz von Oxychinolin zu dem Hydrolysegemisch bewirkt besonders gut reproduzierbare und erhöhte Extinktionswerte. Vermutlich werden dadurch Metallspuren, die als Oxydationsmittel wirken könnten, komplex abgebunden. Desgleichen erhöht und stabilisiert ein

⁹ W. S. Hoffmann, J. biol. Chemistry **73**, 15 [1927].

¹⁰ G. Jayme u. P. Sarten, Naturwiss. **28**, 822 [1940]; Biochem. Z. **308**, 109 [1941]; ebenda **310**, 1 [1941]; ebenda **312**, 78 [1942].

¹¹ E. I. Fulmer, L. M. Christensen, R. M. Hixon u. R. L. Foster, J. physic. Chem. **40**, 133 [1936].

* Leider war uns die Originalarbeit von Davidson u. Wymouth, Biochem. J. **38**, 39 [1944], die Xylol verwenden, nicht zugänglich.

Furfurol γ	Extinktionswerte	
	ohne	mit
	Hydrolyse	
2	487,3	348,6
2	487,8	332,7
2	478,9	361,0
2	474,4	370,1
2	465,1	384,1
2	447,3	341,5
2	469,9	339,1
2	478,1	356,5
Mittelwert	$473,6 \pm 4,3\%$	$354,2 \pm 7,3\%$
	100%	$75\% \pm 5\%$
8	1504,4	1108,8
8	1545,1	1116,3
8	1548,6	1179,8
8	1480,1	
Mittelwert	$1519,5 \pm 2,2\%$	$1135,0 \pm 3,2\%$
	100%	$75\% \pm 3\%$

Tab. 1. Extinktionswerte von 2- γ - und 8- γ -Furfurol-Proben ohne und nach 1½ Stdn. Hydrolyse bei 102 bis 104°C. Zu allen Proben wurde 8-Oxy-chinolin und Ascorbinsäure zugesetzt.

Zusatz von Oxychinolin und Ascorbinsäure** zu dem Chloroform-Reagens-Furfurol-Gemisch den Extinktionswert (Abb. 3).

Nach langwierigen und mühevollen Versuchen wurde schließlich die untenstehende Vorschrift

Abb. 3. Der zeitliche Verlauf der Extinktion einer 2- γ -Furfurolprobe bei verschiedenen Zusätzen.

Abb. 4. Die Eichkurven für Ribonucleinsäure und Furfurol mit und ohne Hydrolyse (1½ Stdn. bei 102–104°C).

	γ Ribonucleinsäure				
	9,04	18,08	36,16	72,4	108,5
Extinktion (Trommel- striche)	153,7	305,2	606,4	1175,7	1547,6
	168,2	325,1	627,8		1499,0
		324,6	600,6		1519,8
		335,7	634,0		1604,0
		320,1	635,5		1521,2
		353,8	629,4		1589,2
		336,8	611,7		1639,7
		303,3	630,0		1556,4
		349,1	649,9		1543,0
		351,5			1618,3
Mittelwert	160,95	$330,5 \pm 7,5\%$	$625,0 \pm 4\%$	1175,7	$1563,8 \pm 4,5\%$

Tab. 2. Ribonucleinsäure-Eichwerte.

zur Bestimmung von 10–110 γ RNS entwickelt. Bei genauer Beachtung derselben ergeben sich die

** Diese Anregungen verdanken wir einer mündl. Mitt. von Prof. R. K u h n, Heidelberg.

in Tab. 1 und in Abb. 4 zusammengestellten Eichwerte für RNS, wobei die Nucleinsäuremenge aus dem experimentell bestimmten P-Gehalt berechnet wurde. Zugrunde gelegt wurde ein Verhältnis von

Phosphor:Furfurol:RNS = 1:3,1:10,5. Das N/P-Verhältnis der verwendeten RNS betrug 1,675 (Bergold und Pister⁵). Die Fehlergrenze ist aus Tab. 1 zu ersehen. Der Extinktionswert bedeutet Trommelstriche am Photometer, nach Abzug des Blindwertes von etwa 80–100 Teilstrichen. Die Furfurol-Skala wurde ebenfalls theoretisch aus dem P-Gehalt berechnet. Aus Tab. 2 und den beiden Furfurol-Geraden in Abb. 4 erkennt man, daß gut reproduzierbar immer 75% der vorgelegten Furfurolmenge wieder gefunden wurden. Dementsprechend findet man auch bei der RNS nur 37,25% (d. h. 75% der nach Ribosegehalt zu erwartenden Furfurolmenge), da unter den Versuchsbedingungen nur die Zucker der beiden Purinbasen abgespalten werden. Mit der vorliegenden Methode konnte nachgewiesen werden, daß bei Polyederviren kein Phosphor in die RNS eingebaut ist.

Ausführung der Ribonucleinsäurebestimmung

Reagenzien: Bromwasserstoffsäure p. a., frisch dest. bei 124°C,

Anilin p. a., frisch dest.,

Eisessig 99–100% puriss. oder p. a.,

Chloroform, frisch dest. über Calciumcarbonat (2-mal) und über Phosphorpentoxyd (1-mal),

8-Oxy-chinolin p. a.,

Ascorbinsäure puriss.,

Furfurol p. a., frisch dest. unter vermindertem Druck; die etwa 0,2-proz. Stammlösung hält sich im Dunkeln, mit Stickstoff überschichtet, einige Tage. Sie wird vor Gebrauch 1:100 verdünnt.

Ribonucleinsäure (Böhringer, Mannheim), etwa 0,04-proz. in 0,01-m. NaHCO₃.

Ausführung: Fülle direkt in die Hydrolyse-Apparatur (Abb. 2) 0,1 cm³ einer 0,06-proz. wäßrigen 8-Oxy-chinolin-Lösung. Gib die zu untersuchende Substanz mit einem Nucleinsäuregehalt von etwa 10 bis 120 γ fest oder gelöst (z. B. in 0,01-m. Bicarbonat) hinzu. Füge sodann soviel aqua bidest. hinzu, daß insgesamt ein Volumen von 5 cm³ entsteht, ferner 5 cm³ klare, farblose Bromwasserstoffsäure. Führe ein kleines Thermometer in die Apparatur ein und setze den Rückflußkühler (mit sehr gut sitzendem Schliff) auf. Bedecke das Glycerinbad mit einer Asbestplatte, die in der Mitte ein Loch für den Ansatz des Hydrolysegefäßes und Löcher für das Kontakt- und das Kontrollthermometer besitzt. Senke das Hydrolysegefäß so weit in das Glycerinbad, daß der Ansatz voll eintaucht und sich der Spiegel des Glycerinbades in gleicher

Höhe wie der Spiegel der Flüssigkeit im Ansatz befindet. Bedecke das Hydrolysegefäß mit einem dunklen Papiermantel (Lichtempfindlichkeit des Furfurols). Stelle das Glycerinbad mit einem Kontaktthermometer auf 106–109°C ein; das Glycerinbad wird von unten elektrisch geheizt. Die Innentemperatur des Hydrolysatges soll 102–104°C betragen. Erhitze 1½ Std. und lasse dann abkühlen. Pipettiere in den Rückflußkühler genau 1 cm³ Chloroform und spüle dieses Chloroform durch drehende Bewegung der Apparatur in das Kölbchen. Hebe den Rückflußkühler ab und schütte den gesamten Kölbcheninhalt unter Abschwung der Kölbchenwände in ein fein auslaufendes Spitzgläschen. Quirle vorsichtig 1½ Min. die Flüssigkeit im Spitzgläschen mit einem Glasstempel, unter Vermeidung von Luftblasen-Bildung. Bringe durch vorsichtiges Aufstoßen des Spitzgläschens alles Chloroform nach unten in die Spitze. Spaffe das Spitzgläschen in ein Stativ. Ziehe mit einer 1-cm³-Injektionspritze das Chloroform vorsichtig in eine erweiterte Glaspipette, die durch einen Gummischlauch mit der Injektionspritze verbunden ist. Vermeide sorgfältig, daß Bromwasserstoffsäure mitgezogen wird. Fülle das abgezogene Chloroform in eine 20-cm³-Mensur, in welche vorher 0,1 cm³ einer wäßrigen 0,06-proz. 8-Oxy-chinolin-Lösung und 0,1 cm³ einer wäßrigen 0,07-proz. Ascorbinsäure-Lösung eingebracht wurde. Fülle nochmals durch den Rückflußkühler direkt in das Spitzgläschen 1 cm³ Chloroform, quirle wie oben und bringe das abgezogene Chloroform in die Mensur. Spüle in gleicher Weise das Hydrolysekölbchen. Nun füge hintereinander noch dreimal je 1 cm³ Chloroform in das Spitzgläschen, quirle durch, ziehe ab und sammle die 3 cm³ Chloroform ebenfalls in der Mensur. Fülle die Mensur mit Chloroform auf 6,5 cm³ auf, füge 0,5 cm³ Anilin und 4 cm³ Eisessig hinzu, schüttele durch und fülle das Gemisch in eine 10-cm³-Mikroküvette mit einer Schichtdicke von 5 cm.

Die kolorimetrische Bestimmung des Extinktionswertes erfolgt am besten im Spektral-Photometer nach Kortüm⁵. Der Blindwert wird in gleicher Weise behandelt wie der Versuchswert, d. h. hydrolysiert, ausgeschüttelt usw. Als Filter wird das blaue Kombinationsfilter von Schott GG 15 + BG 12 (436 mμ) verwendet. Die Rotfärbung erreicht ihren Höhepunkt praktisch unabhängig von der Furfurolmenge in etwa 8–12 Min., vom Durchschütteln in der Mensur an gerechnet. Verglichen wird jeweils der Versuchswert und der Blindwert mit einer mit reinem Chloroform gefüllten Küvette. Der Blindwert schwankt zwischen 80–100 Teilstrichen. Ist er höher, so muß das Anilin frisch destilliert werden. Zur Bestimmung der Trogdifferenz werden beide Küvetten mit Chloroform gefüllt. Nach Berücksichtigung dieser Trogdifferenz wird der Maximal-Extinktionswert der Blindprobe von dem Extinktionswert der Versuchslösung abgezogen.