

# Untersuchungen über die Biosynthese und Bedeutung von Trigonellin in *Coffea arabica*

Autor(en): **Kende, Hans**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **70 (1960)**

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-49487>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# Untersuchungen über die Biosynthese und Bedeutung von Trigonellin in *Coffea arabica*

Von *Hans Kende*

(Aus dem Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich)

Eingegangen am 29. Juni 1960

## Inhalt

I. Einleitung und Fragestellung .....	233
II. Material und Methoden .....	234
III. Der Coffein- und Trigonellengehalt in den vegetativen Organen von <i>Coffea arabica</i> .....	236
IV. Zur Biosynthese der Nikotinsäure .....	241
1. Überblick über die bisherigen Forschungsergebnisse .....	241
2. Versuche bei <i>Coffea arabica</i> .....	244
V. Trigonellinsynthese bei Fütterung von Nikotinsäure .....	245
VI. Trigonellinsynthese bei Fütterung von Nikotinsäureamid .....	247
VII. Der Einfluß des Lichtes auf die Methylierung der Nikotinsäure und des Nikotinsäureamids zu Trigonellin .....	249
VIII. Die Bedeutung des Trigonellins im Stoffwechsel von <i>Coffea arabica</i> .....	251
1. Trigonellin reagiert nicht als Methylendonator .....	251
2. Der Transport des Trigonellins .....	254
IX. Methylierungsvorgänge .....	257
X. Beziehungen zwischen der Coffein- und Trigonellinsynthese .....	260
XI. Diskussion .....	262
XII. Zusammenfassung .....	263
Literaturverzeichnis .....	265

Die vorliegende Arbeit entstand im Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hans Wanner. Für sein kritisches Interesse, seine wertvollen Hinweise und seine stets gewährte großzügige Unterstützung bin ich ihm zu herzlichstem Dank verpflichtet. Herr Professor Wanner stellte mir alle notwendigen Apparate und radioaktiven Substanzen zur Verfügung und erlaubte mir, im fortgeschrittenen Stadium meiner Arbeit die Hilfe seiner Laborantinnen in Anspruch zu nehmen.

Allen Angestellten des Instituts, die mir bereitwillig manche Gefälligkeiten erwiesen, und besonders Frau M. Stampfli, welche mir bei der Durchführung von Versuchen eine gute Hilfe war, spreche ich ebenfalls meinen besten Dank aus.

## I. Einleitung und Fragestellung

Trigonellin, ein am Stickstoff methyliertes Derivat der Nikotinsäure (siehe Fig. 6), ist ein Stoffwechselprodukt, welches im Pflanzen- und Tierreich allgemein verbreitet ist. Es wurde gemeinsam mit der Nikotinsäure von Jahns (1885) zum erstenmal in den Samen von *Trigonella foenum graecum* L. nachgewiesen. Die enge strukturelle Verwandtschaft der beiden Stoffe ließ bald die Vermutung aufkommen, daß der eine aus dem anderen hervorgehe. In der Tat konnte Ackermann (1912) nach Verfütterung von Nikotinsäure im Urin eines Hundes einen erhöhten Trigonellengehalt feststellen. In neueren Experimenten gelang es, in Lebergewebekulturen von Ratten eine Trigonellinsynthese bei Zugabe von Nikotinsäureamid zu bewirken (Perlzweig u.a. 1943). Ähnliche Versuche mit höheren Pflanzen führten zu gleichen Ergebnissen (Zeijlmaaker 1953, Blake 1954).

Vitaminforscher gingen von einem anderen Gesichtspunkt an das Problem heran. Nachdem Elvehjem und seine Mitarbeiter 1937 die Antipellagrawirksamkeit der Nikotinsäure und dessen Amids entdeckt hatten, stellte sich die Frage, ob auch das Trigonellin als Vitamin wirksam sei. Mit anderen Worten gesagt, galt es, abzuklären, ob die Methylierung der Nikotinsäure ein reversibler Prozeß ist und ob das Trigonellin im Organismus demethyliert wird (Kühnau 1942, Ciusa 1948). Die Meinungen darüber gehen auseinander, besonders auch deshalb, weil keine einheitliche, für alle Organismen gültige Antwort gegeben werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Trigonellinsynthese in den Blättern von *Coffea arabica* abzuklären. Es stellte sich zuerst die Frage, ob auch bei dieser Pflanze der Trigonellengehalt zunimmt, wenn Nikotinsäure gefüttert wird. Ferner wurde untersucht, welchen Einfluß Belichtung und Verdunkelung auf die Methylierung der Nikotinsäure



haben. Besonderes Interesse war der Bedeutung des Trigonellins im Stoffwechsel der Kaffeepflanze gewidmet. Dabei mußten vier Möglichkeiten ins Auge gefaßt werden. Wird Trigonellin demethyliert und wirkt es als Methyldonator? Wird es im Organismus weiter abgebaut oder als Baustein zu anderen Verbindungen verwendet? Oder stellt es ein Endprodukt im Stoffwechsel der Pflanze dar, welches nicht mehr verändert wird? In diesem Zusammenhang wurde auch der Transport des Trigonellins in der Pflanze verfolgt. Für letztere Experimente kam  $C^{14}$ -markiertes Trigonellin zur Verwendung. Des weiteren wurde untersucht, welche Methyldonatoren für die Methylierung der Nikotinsäure in Frage kommen und ob das Trigonellin und Coffein tatsächlich gemäß der von Kremers (1954) aufgestellten These aus dem DPN (Diphosphopyridinnukleotid) gebildet würden.

## II. Material und Methoden

Zu unseren Versuchen verwendeten wir selbst aufgezogene Kaffeepflanzen von der brasilianischen Sorte « Bourbon ». Frische Samen keimen bei einer Temperatur von 25 °C zu 80 % bis 90 % aus. Ihre Keimfähigkeit geht mit zunehmendem Alter rasch zurück. Von dreimonatigen Samen kommen nur noch etwa 30 % zur Entwicklung, während nach einem halben Jahr keine Keimung mehr erzielt werden konnte. Die Pflanzen halten sich im Gewächshaus bei konstanter Temperatur (25 °C), hoher Luftfeuchtigkeit (70 % bis 80 %) und täglich langer Belichtungszeit (16 Stunden) sehr gut.

Je nach Versuchsanordnung verwendeten wir Blattfolgen von Ästen mehrjähriger Kaffeebäume oder kleine Pflanzen. Die dekussierte Blattstellung an der Kaffeepflanze erwies sich für unsere Experimente als sehr vorteilhaft, da stets zwei annähernd gleich große und gleich alte Blätter zur Verfügung standen.

In Voruntersuchungen wurde festgestellt, daß die Gegenblätter eines Blattpaares pro Gewichtseinheit nahezu gleichviel Trigonellin enthalten. So kann das eine Blatt mit einer bestimmten Lösung gefüttert werden, während das Gegenblatt als Kontrolle dient. Sollten zwei Substanzen, zum Beispiel Nikotinsäure und Nikotinsäureamid, in ihrer Wirkung miteinander verglichen werden, schnitten wir je eine Hälfte der beiden Parallelblätter der Mittelrippe entlang ab und gewannen so zwei Kontrollen. Die anderen Blatthälften wurden mit den verschiedenen Lösungen über die Mittelrippe gefüttert. Nach Versuchsabbruch entfernten wir die Mittelrippe und analysierten sie für sich. Die Blatthälften wurden in ihrem Trigonellin- beziehungsweise Coffeingehalt pro Flächeneinheit miteinander verglichen. Im Verlauf der Fütterung verändern sich nämlich die Frischgewichte der behandelten Blatthälften gegenüber den früher abge-



schnittenen Kontrollhälften, so daß das Gewicht nicht als Bezugsgröße zu gebrauchen ist.

In einer Reihe von Experimenten benötigten wir vier Portionen homologen Blattmaterials, von denen drei verschiedenen Versuchsbedingungen unterworfen werden konnten und die vierte die Kontrollwerte lieferte. Zu diesem Zweck verwendeten wir Blattscheiben, die wir aus der Spreite austachen und mit Nikotinsäure oder einer anderen zu prüfenden Substanz im Vakuum infiltrierten. Diese Vakuuminfiltration wurde von Mothes (1933) und Belosersky u.a. (1956) beschrieben und unseren Bedürfnissen angepaßt. Die frischgestanzten Scheibchen von 16 mm oder 20 mm  $\varnothing$  werden gewogen, in ein Röhrchen verbracht, beschwert und mit der Lösung übergossen. Mehrere solche Röhrchen stellt man in ein größeres Infiltrationsgefäß und pumpt die Luft heraus. Nach zehn Minuten Infiltration läßt man die Luft wieder langsam einströmen. Die Blattscheiben werden abgespült, abgetrocknet und möglichst schnell wieder gewogen. Aus der Differenz des Gewichtes vor und nach der Infiltration ermittelt man die Menge der aufgenommenen Lösung. Das infiltrierte Wasser läßt man aus dem Gewebe verdunsten, indem man die Scheibchen, Unterseite nach oben, zwischen zwei aufgespannte Gazetücher legt und leicht mit dem Föhn bewindet. Dadurch verlieren sie ihr glasiges Aussehen und gewinnen ihre ursprüngliche Farbe zurück. Die so behandelten Blattscheiben werden nun für die Dauer des Versuches in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Je nach Infiltrationslösung halten sie sich ohne Verfärbung bis vier Tage. Da es bei unseren Experimenten darauf ankam, mehrere Portionen von homologem Material zur Verfügung zu haben, mußte zuerst untersucht werden, ob das Coffein und Trigonellin gleichmäßig im Blatt verteilt sind. Es zeigte sich, daß in der Blattspitze zumindest das Coffein in höherer Konzentration vorhanden ist als in der Blattbasis. Deswegen verteilten wir die 16 aus einem Blattpaar gewonnenen Scheiben nach folgendem Schema in 4 Portionen:

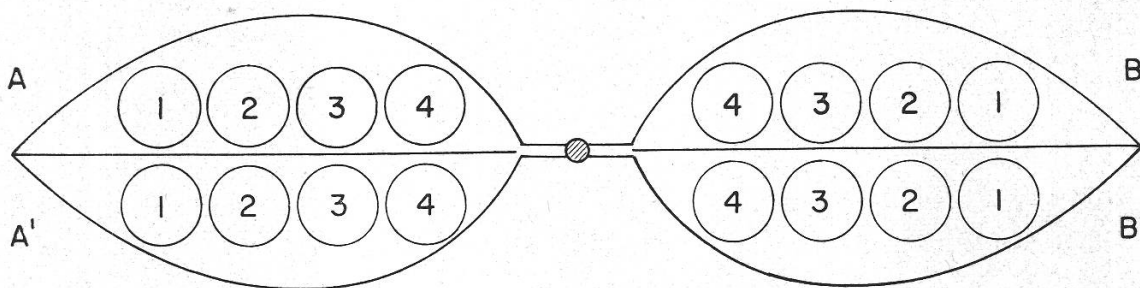
Portion 1: A'1-B 2-A 3-B'4

Portion 3: B'1-A 2-B 3-A'4

Portion 2: A 1-B'2-A'3-B 4

Portion 4: B 1-A'2-B'3-A 4

(Siehe Figur 1).



Figur 1

Verteilungsschema der Blattscheiben

Jede Portion erhält so je eine Scheibe von jeder Stellung.

Nach Versuchsabbruch wurden die Kaffeeblätter beziehungsweise in folgender Weise extrahiert (verändert nach Kogan u.a. 1953, Paech und Tracy 1955). Man zerschneidet sie fein und kocht sie 20 Minuten in 10 ml Wasser, welches mit 2,5 ml 0,05 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> angesäuert ist. Die Lösung läßt man abkühlen, gibt 1,25 g Magnesiumoxyd zu und kocht wieder 20 Minuten lang. Der so gewonnene Extrakt wird filtriert und das Filtrat eingedampft. Den Rückstand nimmt man mit 1,0 ml destilliertem Wasser auf und chromatographiert ihn. Je nach Fütterungssubstanz verwendeten wir drei verschiedene Laufmittel.

Laufmittel A: Äthanol 96% – Ammoniak – Wasser, 90:5:10

Laufmittel B: Iso-Propanol – HCl konz. – Wasser, 85:22:18

Laufmittel C: n-Butanol – Ammoniak – Wasser, 100:2:16

(Kramer 1958, Linskens 1959.) (Siehe Tabelle 1.)

Tabelle 1

R<sub>F</sub>-Werte. Absteigend chromatographiert auf Whatman-Papier Nr. 1 bei einer Temperatur von 20 °C

	Laufmittel A	Laufmittel B	Laufmittel C
Coffein	0,86	0,70	0,68
Trigonellin	0,36	0,52	0,04
Nikotinsäure	0,68	0,49	0,13
Nikotinsäureamid	0,87	0,36	0,66

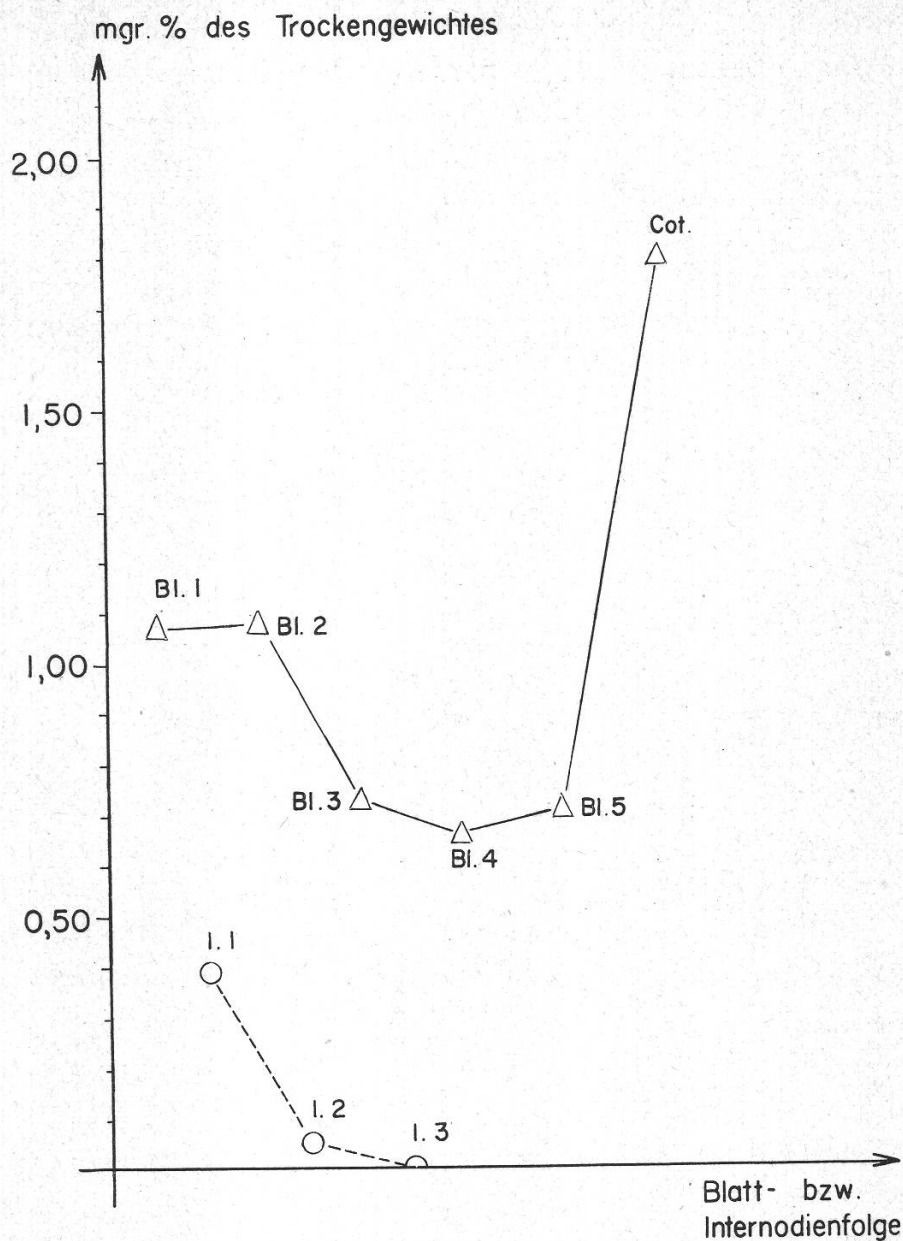
Die UV-absorbierenden Flecken von Coffein, Trigonellin und den verwendeten Nährlösungen werden aus dem Chromatogramm ausgeschnitten und direkt im Reagenzglas unter Schütteln mit 5 ml 0,1 n Salzsäure eluiert. Quantitativ wertet man die Versuche aus, indem man die Ultraviolett-Absorption der Eluate im Spektrophotometer mißt.

### III. Der Coffein- und Trigonellingehalt in den vegetativen Organen von *Coffea arabica*

Der Coffein-, Trigonellin- und auch Nicotinsäuregehalt in Kaffeebohnen ist oft untersucht worden, und es liegen darüber verschiedene Arbeiten vor (Moore u.a. 1951, Adamo 1955 a, 1955 b, Hadorn u.a. 1956).

Der Nikotinsäure- und Trigonellingehalt in den Blättern verschiedener Wildpflanzen wurde von Schormüller und Feuersenger (1952)





Figur 2

Coffeingehalt in den Blättern und Internodien einer jungen Pflanze  
 Die Blätter und Internodien wurden von oben nach unten numeriert  
 Bl. = Blattpaar, Cot. = Cotyledonen, I. = Internodium)

ermittelt. Ihre Untersuchungen erstreckten sich jedoch nicht auf die Kaffeepflanze.

Der *Coffeingehalt* in den vegetativen Organen von *Coffea arabica* beschränkt sich fast nur auf die Blätter, wobei in den jüngeren immer eine größere Menge von Coffein gefunden wird als in den älteren (Weevers 1930). Eine Ausnahme darin machen nur die Cotyledonen, wo offenbar vom Samen her noch viel Coffein verblieben ist. In den Internodien des Stengels kann nur in den jüngsten Teilen Coffein nachgewiesen werden,



während es weiter unten und in der Wurzel fehlt. Diese Tatsache spricht dafür, daß das Coffein in der Pflanze nicht oder höchstens in sehr geringem Ausmaß transportiert wird. (Siehe Tabelle 2, Figur 2.)

Tabelle 2

Coffeingehalt in einer jungen Kaffeepflanze  
Die Blattpaare sowie Internodien werden von oben nach unten numeriert

Pflanzenteil	Coffeingehalt absolut mg	Coffeingehalt in mg% Wassergehalt	Coffeingehalt in mg% Trockengewicht
Blattpaar 1	1,25	0,31	1,07
Blattpaar 2	1,54	0,34	1,08
Blattpaar 3	1,28	0,25	0,73
Blattpaar 4	0,56	0,27	0,66
Blattpaar 5	0,82	0,27	0,71
Cotyledonen	1,60	0,70	1,80
Internodium 1	0,06	0,09	0,39
Internodium 2	0,01	0,01	0,05
Internodium 3 bis Hypocotyl	—	—	—
Wurzel	—	—	—

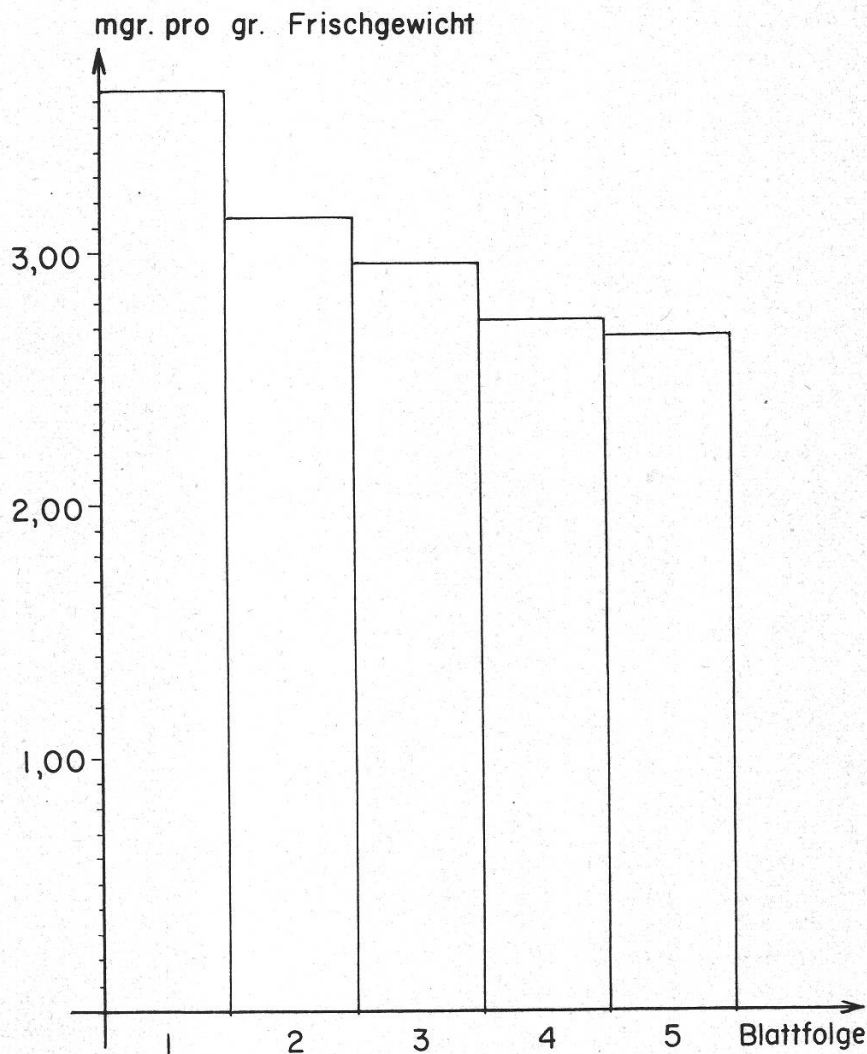
Da in den folgenden Experimenten hauptsächlich Blätter von Ästen mehrjähriger Pflanzen verwendet wurden, ist es wesentlich, auch für

Tabelle 3

Trigonellingehalt in einer jungen Kaffeepflanze  
Blattpaare sowie Internodien werden von oben nach unten numeriert

Pflanzenteil	Trigonellingehalt absolut mg	Trigonellingehalt in mg% Wassergehalt	Trigonellingehalt in mg% Trockengewicht
Blattpaar 1	1,23	0,31	1,06
Blattpaar 2	0,90	0,20	0,63
Blattpaar 3	0,70	0,14	0,40
Blattpaar 4	0,20	0,10	0,24
Blattpaar 5	0,18	0,06	0,16
Cotyledonen	0,31	0,10	0,35
Internodium 1	0,32	0,46	2,12
Internodium 2	0,17	0,24	0,83
Internodium 3	0,11	0,14	0,43
Internodium 4	0,08	0,13	0,35
Internodium 5	0,07	0,10	0,19
Hypocotyl	0,24	0,09	0,16
Wurzel	0,16	0,02	0,08

solche Blattfolgen die Verteilung des Coffeins zu untersuchen. Es wurde dabei festgestellt, daß neben dem Blattparenchym auch die Mittelrippen und die Seitennerven, das heißt die Leitbündel, Coffein enthalten. (Siehe Figur 3.)

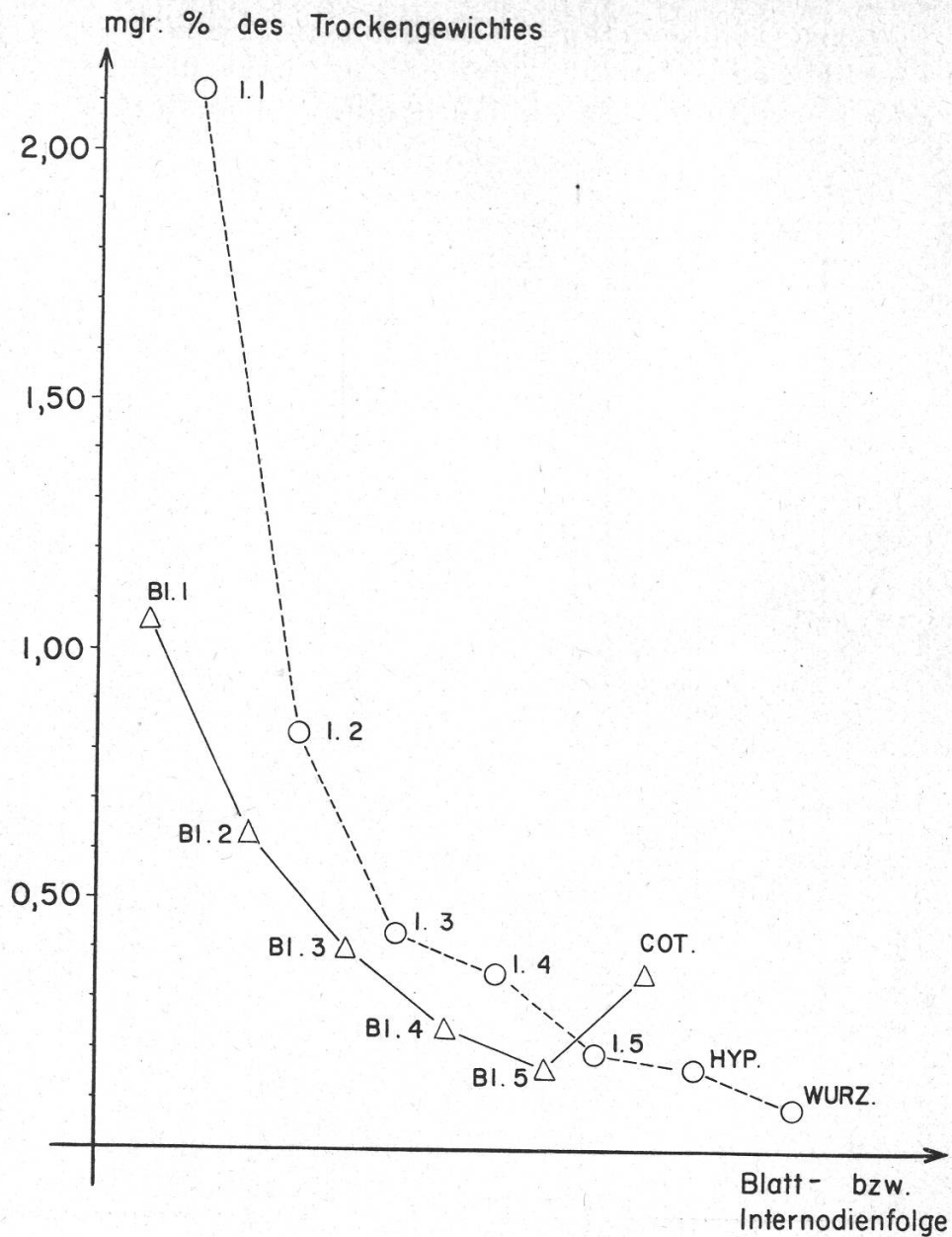


Figur 3

Coffeingehalt in einer Folge von fünf Blättern

Mittelwerte von drei annähernd gleich alten Ästen; die Blätter wurden vom jüngsten gegen die älteren numeriert

Der *Trigonellengehalt* in einer kleinen Kaffeepflanze nimmt wie der Coffeingehalt von den jüngeren Blättern gegen die älteren ab und steigt nur in den Cotyledonen wieder leicht an. Es zeigt sich hingegen, daß in den Internodien und in der Wurzel Trigonellin in größeren Mengen vorhanden ist, zum Teil sogar in höheren Konzentrationen wie in den Blättern. Das läßt die Annahme zu, daß das Trigonellin in der Pflanze im Gegensatz zum Coffein transportiert wird. (Siehe Tabelle 3, Figur 4.)



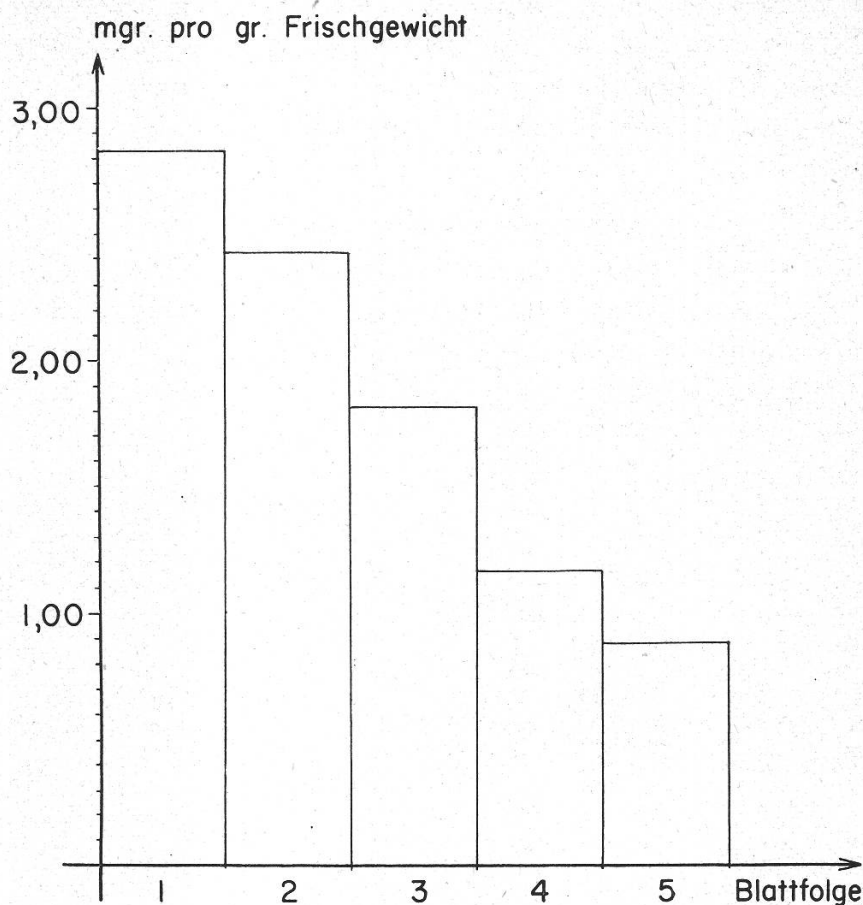
Figur 4

Trigonellengehalt in den Blättern, Internodien und Wurzel einer jungen Kaffeepflanze. Die Blätter und Internodien wurden von oben nach unten nummeriert. (Bl. = Blattpaar, Cot. = Cotyledonen, I. = Internodium, Hyp. = Hypocotyl, Wurz. = Wurzel.)

Untersuchungen über den Trigonellengehalt in den Blattfolgen älterer Zweige zeigen wieder deutlich eine Abnahme des Trigonellins vom jüngsten Blatt bis zum ältesten, wobei aber das Gefälle steiler ist als beim Coffein. Auch Trigonellin findet sich in den Mittelrippen und Seitennerven. (Siehe Figur 5.)

Zeijlemaker (1953) und Blake (1954) wendeten zu *Nikotinsäurebestimmungen* in *Pisum sativum* beziehungsweise in *Zea Mays* mikrobiologische Nachweismethoden an. Sie erfaßten durch die Benützung von





Figur 5

Trigonellengehalt in einer Folge von fünf Blättern

Mittelwerte von drei annähernd gleich alten Ästen; die Blätter wurden vom jüngsten gegen die älteren numeriert

*Lactobacillus arabinosus* nebst der freien Nikotinsäure, die nur in ganz geringen Mengen vorkommt, auch die Nikotinursäure, das Nikotinsäureamid und das in den Cofermenten I und II gebundene Nikotinsäureamid. Unsere Arbeitsweise, die auf Papierchromatographie und Spektrophotometrie beruht, gestattete es nicht, Angaben über den natürlichen Gehalt an freier Nikotinsäure in *Coffea arabica* zu erbringen. Wie auch die Untersuchungen von Schormüller und Feuersenger (1952) zeigen, kommt freie Nikotinsäure in den meisten Pflanzen nur in Spuren vor oder jedenfalls in Mengen, die immer viel kleiner sind als diejenigen des Trigonellins.

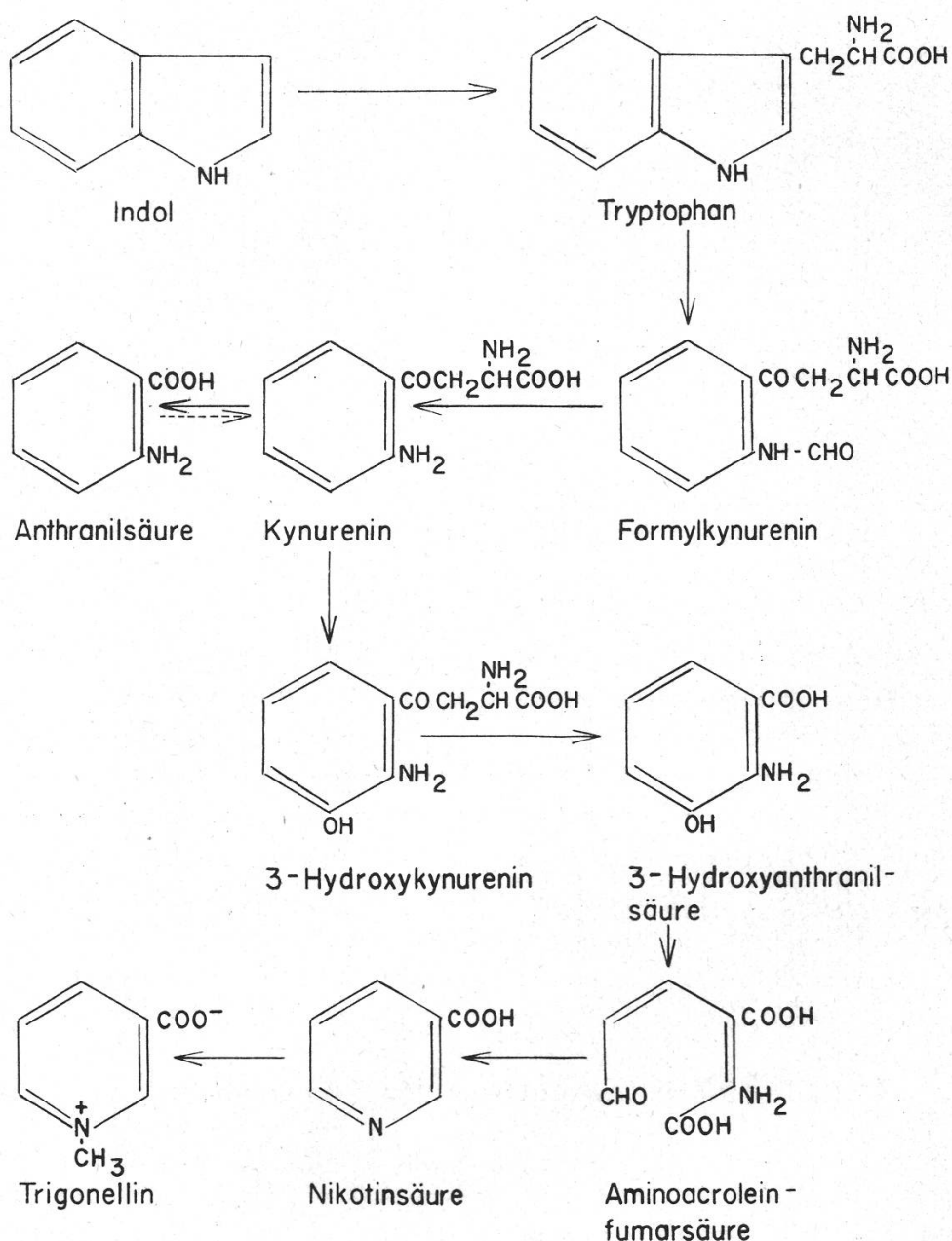
#### IV. Zur Biosynthese der Nikotinsäure

##### 1. Überblick über die bisherigen Forschungsergebnisse

Der Pyridinring kommt allgemein in den Pflanzen in zwei Formen vor: Im Vitamin-B<sub>6</sub>-Komplex (Pyridoxin, Pyridoxal, Pyridoxamin) und als Nikotinsäure mit ihren freien Derivaten oder in ihrer gebundenen

Form (Nikotinsäureamid, Trigonellin, N-Methylnikotinsäureamid, Coferment I und II). In einer Reihe von Experimenten ist die Biosynthese des Pyridinringes untersucht worden. Dabei kamen zwei Forschungsmethoden zur Anwendung.

Beadle und seine Mitarbeiter verfolgten die Nikotinsäuresynthese mit Hilfe der Mutante 65001 von *Neurospora crassa*, welche zum Wachstum Nikotinsäure benötigt (Beadle u.a. 1947). Sie stellten dabei fest, daß Wachstum eintritt, wenn dem Medium Indol, Tryptophan, Kynurenin oder 3-Hydroxykynurenin beigegeben wird. In einem weiteren Versuch mit der Mangelmutante 39401 von *Neurospora crassa*, welche ebenfalls



Figur 6

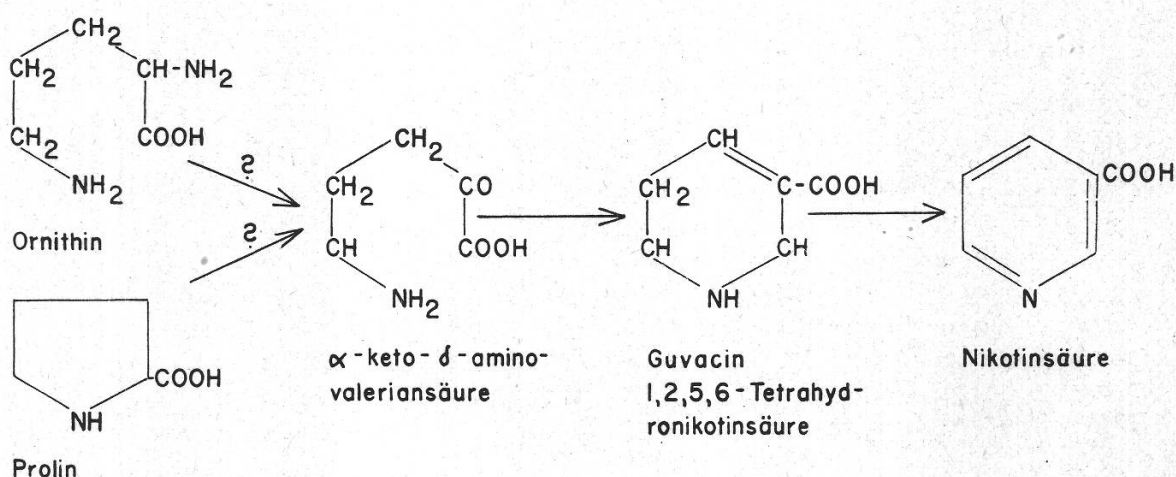
Die Bildung der Nikotinsäure im Tryptophanstoffwechsel

Nikotinsäure als Wachstumsfaktor braucht, erzielte man durch Zusatz von N<sup>15</sup>-markiertem Indol das gleiche Ergebnis (Bonner u.a. 1950). Tryptophan und 3-Hydroxyanthranilsäure als Vorstufen der Nikotinsäure wurden ebenfalls bei *Neurospora* ermittelt (Mitchell 1948a, Leifer u.a. 1950, Partridge u.a. 1952).

Eine analoge Synthesefolge wurde bei Säugetieren (Mitchell u.a. 1948b, Knox u.a. 1950, Heidelberger u.a. 1948, Dalglish 1951, Hankes u.a. 1954) und auch bei höheren Pflanzen (Gustafson 1949, Nason 1949) gefunden. Bei diesen Objekten griff man zur zweiten Untersuchungsmöglichkeit, die darin bestand, in Frage kommende Vorstufen zu füttern und hernach die zusätzliche Synthese von Nikotinsäure zu messen. Es wurden dabei auch radioaktive Präparate zur Markierung der Zwischenstufen verwendet.

Darnach kann das in Figur 6 gezeigte Reaktionsschema aufgestellt werden.

Neuere Arbeiten, die besonders an höheren Pflanzen, aber auch an Mikroorganismen ausgeführt wurden, ergaben jedoch Resultate, die von den bisherigen abweichen. Bei Fütterung von C<sup>14</sup>-markiertem Tryptophan zeigte es sich, daß dieses keine Vorstufe des Damascenins in *Nigella damascena* L. und des Trigonellins in *Pisum sativum* ist (Leete u.a. 1955). Offenbar wird die 3-Hydroxyanthranilsäure als Vorstufe des Damascenins und der Pyridinring als Vorstufe des Trigonellins auf Grund eines Reaktionsweges gebildet, der nicht über das Tryptophan führt. Dieses Resultat wurde durch Arbeiten mit *Nicotiana tabacum* L. bestätigt, wo markiertes Tryptophan und Anthranilsäure im Pyridinkern des Nikotins ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnte (Leete 1957, Grimshaw u.a. 1958). Versuche mit *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* zeigten, daß auch in



Figur 7

Die Bildung der Nikotinsäure aus Ornithin und Prolin  
Schema verändert nach Klein u.a. (1932) und Guggenheim (1951)



diesem Fall keine Beziehung zwischen Tryptophan und Nikotinsäure besteht (Yanofsky 1954). Schließlich wies Aronoff (1956) nach, daß 3-Hydroxyanthranilsäure keine Vorläuferin der Nikotinsäure und des Trigonellins in den Blättern der Sojabohne ist.

Einen Alternativweg zu der von Beadle u.a. beschriebenen Synthesefolge der Nikotinsäure stellten Euler u.a. (1944) in Versuchen mit *Staphylococcus aureus* und *Proteus vulgaris* auf, welche Guvacin statt Nikotinsäure als Wachstumsfaktor verwerten können.

Erwähnt seien auch die frühen Experimente von Klein u.a. (1932), welche Prolin als Vorstufe des Trigonellins in Dahlia ermittelten. Allerdings wurde seither die Wirksamkeit von Prolin auf die Synthese der Nikotinsäure nicht mehr überprüft. (Siehe Figur 7.)

Fütterung von Ornithin und Citrullin sowie auch von Tryptophan und Pyridoxin allein und in Kombination ergab bei *Pisum sativum* keine Steigerung des Nikotinsäure- oder Trigonellingehaltes (Zeijlemaker 1953).

## 2. Versuche bei *Coffea arabica*

In Versuch 24 wurde ermittelt, ob bei *Coffea arabica* Tryptophan, Prolin oder Ornithin Vorstufen der Nikotinsäure darstellen. Aus zwei jüngsten Blättern, die physiologisch sehr aktiv sind, wurden je vier Portionen von Blattscheiben ausgestochen. Drei Portionen infiltrierten wir mit Tryptophan, Prolin beziehungsweise Ornithin, während die vierte als Kontrolle diente. (Siehe Tabelle 4.)

Tabelle 4

Prüfung von Tryptophan, Prolin und Ornithin als Vorstufen der Nikotinsäure beziehungsweise des Trigonellins

### Versuchsanordnung

Versuch 24: Die Blattscheibchen von 16 mm  $\varnothing$  wurden mit einer 0,03 mol Lösung von Tryptophan, Prolin beziehungsweise Ornithin infiltriert und im Dunkeln in Raum mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei einer Temperatur von 22 °C aufbewahrt. Versuchsabbruch nach 48 Stunden. Trigonellingehalt bezogen auf 4 Blattscheiben.

Trigonellingehalt in Kontrollen mg	Trigonellingehalt nach Infiltration von Tryptophan mg	Trigonellingehalt nach Infiltration von Prolin mg	Trigonellingehalt nach Infiltration von Ornithin mg
0,20	0,17	0,17	0,20
0,25	0,25	0,25	0,24

Da der Trigonellingehalt nach der Infiltration von Tryptophan, Prolin und Ornithin nicht anstieg, können diese drei Aminosäuren als Vorstufen des Pyridinringes bei *Coffea arabica* ausgeschlossen werden. Allerdings müßte der Versuch zur eindeutigen Abklärung mit markierten Substanzen wiederholt werden.

## V. Trigonellinsynthese bei Fütterung von Nikotinsäure

Die zusätzliche Bildung von Trigonellin bei Fütterung von Nikotinsäure wurde an zwei höheren Pflanzen, *Pisum sativum* (Zeijlemaker 1953) und *Zea Mays* (Blake 1954) beschrieben. Auf Grund molarer Berechnungen konnte Zeijlemaker die im Versuch verarbeitete Nikotinsäure zu 96% im überschüssig gebildeten Trigonellin wiederfinden. Eine ähnliche Bilanz stellte Blake auf, wobei sich aber in ihren Experimenten zwischen der Menge verbrauchter Nikotinsäure und mehrgebildeten Trigonellins ein Manko bis zu 30% ergab.

In unseren Versuchen verwendeten wir zur Fütterung eine 0,3% oder 0,4% Nikotinsäurelösung. Die Blätter wurden entweder mit ihren Stielen in die Lösung eingetaucht oder die aus der Spreite ausgestochenen Blattscheiben nach der im Kapitel II beschriebenen Methode mit Nikotinsäurelösung infiltriert. Es zeigte sich, daß die Nikotinsäure auf das Gewebe der Blätter von *Coffea arabica* toxisch wirkt, eine Erscheinung, die in den beiden oben zitierten Arbeiten nicht erwähnt wird. Bei Nikotinsäureaufnahme durch die Mittelrippe beginnt sich diese nach zwei bis drei Tagen braun zu färben. Die Bräunung greift bald auf das benachbarte Gewebe über und breitet sich den Seitennerven folgend auf das übrige Blattparenchym langsam aus. Die Scheibchen verfärben sich in den ersten 6 Stunden nach der Vakuuminfiltration am Rande in einer Breite von 1 bis 2 mm, bleiben aber im Innern grün. Erst eine Nikotinsäurekonzentration von über 0,4% bewirkt die Bräunung der ganzen Scheibchen. Die mit Wasser infiltrierten Kontrollscheibchen bewahren ihre Farbe und können in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bis 4 Tage ohne Schädigung gehalten werden. Die Neutralisation der Nikotinsäure vermag ihre toxische Wirkung nicht aufzuheben. Aus diesem Grunde wurde später Nikotinsäureamid als Fütterungssubstanz ausprobiert.

Die Blattextrakte wurden mit Laufmittel A (Äthanol – Ammoniak – Wasser, 86:5:14) chromatographiert. Die quantitative Auswertung ergab immer eine Steigerung des Trigonellingehaltes im Vergleich zu den nicht-behandelten Gegenblättern oder Blattscheiben. (Siehe Tabelle 5.) Eine Nikotinsäure-Trigonellin-Bilanz konnte nicht erstellt werden, da in allen Experimenten ein Manko von 50% und mehr nicht mehr auffindbarer Nikotinsäure auftrat.

Tabelle 5

## Steigerung des Trigonellengehaltes bei Fütterung von Nikotinsäure

## Versuchsordnung

- Versuch 2: Ganze Blätter wurden mit einer 0,4 % Nikotinsäurelösung im Dunkeln gefüttert. Versuchsabbruch nach 96 Stunden. Trigonellengehalt bezogen auf 1g Frischgewicht, Summe aus 5 Proben (Blattpaare 1-5).
- Versuch 3: Analog zu Versuch 2. Trigonellengehalt bezogen auf 1g Frischgewicht, Summe aus 4 Proben (Blattpaare 1-4).
- Versuch 4: Es wurden Blattscheiben von 20 mm  $\varnothing$  mit einer 0,35 % Nikotinsäurelösung infiltriert und im Hellen und Dunkeln aufbewahrt. Versuchsabbruch nach 24 Stunden. Trigonellengehalt bezogen auf 4 Blattscheiben, Summe aus 6 Proben (Blattpaare 1-3).
- Versuch 10: Ganze Blätter wurden mit einer 0,3 % Nikotinsäurelösung gefüttert und im Dunkeln gehalten. Versuchsabbruch nach 96 Stunden. Trigonellengehalt bezogen auf 1g Frischgewicht, Summe aus 3 Proben (Blattpaare 1-3).
- Versuch 11: Ganze Blätter gefüttert mit 0,1 % Nikotinsäurelösung und im Hellen aufbewahrt. Trigonellengehalt bezogen auf 1g Frischgewicht, Summe aus 3 Proben (Blattpaare 1-3). Versuchsabbruch nach 96 Stunden.
- Versuch 18: Blatthälften gefüttert mit 0,3 % Nikotinsäurelösung und im Hellen gehalten. Versuchsabbruch nach 48 Stunden. Trigonellengehalt bezogen auf 10 cm<sup>2</sup> Blattfläche, Summe aus 6 Proben (Blattpaare 1-3).

Alle Pflanzen wurden bei 20 bis 22 °C Temperatur und 70 % bis 100 % Luftfeuchtigkeit gehalten.

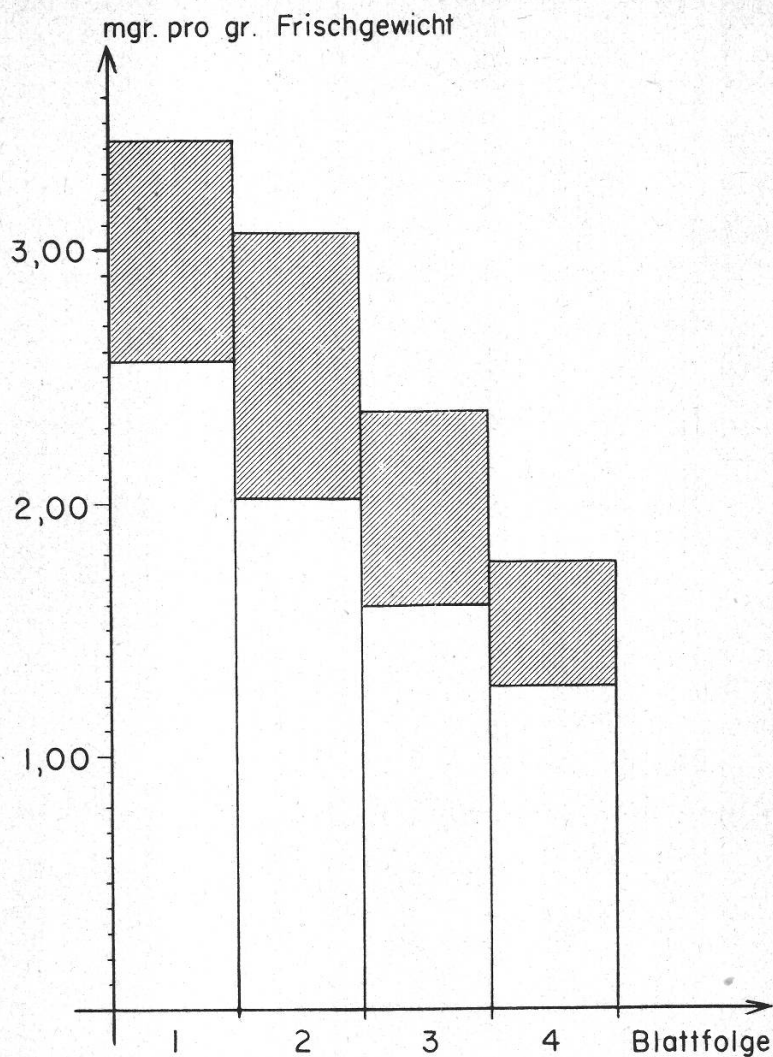
Versuch	Trigonellengehalt in Kontrollen mg	Trigonellengehalt in gefütterten Blättern mg	Trigonellin- überschuß mg	Trigonellin- überschuß %
2	11,11	14,00	2,89	26,0
3	7,44	10,62	3,18	42,7
4	2,50	3,47	0,97	38,8
10	3,69	5,62	1,93	52,3
11	7,01	8,61	1,60	22,8
18	1,89	3,16	1,27	67,2
Total	33,64	45,48	11,84	35,2

Die detaillierte Auswertung von Versuch 3 ergibt folgendes Bild. (Siehe Figur 8.)

Die Nikotinsäure-Trigonellin-Bilanz von Versuch 11 wurde in Tabelle 6 aufgestellt.

Ein wenig günstiger fiel die Trigonellin-Nicotinsäure-Bilanz im Versuch 4 aus, wo die Scheibchen weniger Nikotinsäurelösung aufnahmen. Die Gesamtauswertung des Versuches ergab, daß 38,8 % der infiltrierten Nikotinsäure nicht mehr nachgewiesen werden konnte.





Figur 8

Steigerung des Trigonellingehaltes bei Fütterung von Nikotinsäure  
Auswertung von Versuch 3

Die weiße Säule gibt den Trigonellingehalt des Kontrollblattes auf 1g Frischgewicht berechnet an, während die schraffierte darüber stehende Säule die Menge des im gefütterten Gegenblatt zusätzlich synthetisierten Trigonellins anzeigt. Die Blätter des Astes wurden vom jüngsten gegen die älteren numeriert

## VI. Trigonellinsynthese bei Fütterung von Nikotinsäureamid

Da Nikotinsäure einen schädigenden Einfluß auf das pflanzliche Gewebe ausübt, war es naheliegend, die Wirksamkeit von Nikotinsäureamid als Vorstufe des Trigonellins zu untersuchen. Wiederum wurden ganze Blätter gefüttert oder Blattscheiben infiltriert. Es zeigte sich, daß das Nikotinsäureamid sogar in einer Konzentration von 1% keine Bräunung der Blätter bewirkt. Selbst die infiltrierten Scheibchen können einige Tage in der feuchten Kammer aufbewahrt werden, ohne daß sie vom Rand her nach innen zu welken beginnen. Zum Chromatographieren der Blatt-

Tabelle 6

Bilanz zwischen aufgenommener Nikotinsäure und mehrgebildetem Trigonellin  
Auswertung von Versuch 11

## Versuchsordnung

Siehe Tabelle 7. Trigonellingehalt bezogen auf 1g Frischgewicht

Blatt- paar	Aufgenomme- ne Nikotins. mikromol	Rückgew. Nikotinsäure mikromol	Verarbeitete Nikotinsäure mikromol	Trigonellin- überschuß mikromol	Nicht nachweisbare Nikotinsäure mikromol	Nicht nachweisbare Nikotinsäure %
1	14,8	3,3	11,5	2,9	8,6	74,8
2	21,1	4,7	16,4	3,2	13,2	80,5
3	26,2	4,5	21,7	5,5	16,2	74,7
Total	62,7	12,5	49,6	11,6	38,0	76,6

extrakte verwendeten wir das Laufmittel B (Isopropanol – Salzsäure konz. – Wasser, 85:22:18). Wie die Versuche zeigten, wird das Nikotinsäureamid wenigstens teilweise in der Pflanze desaminiert und die so gebildete Nikotinsäure anschließend zu Trigonellin methyliert. Ein kleiner

Tabelle 7

Steigerung des Trigonellingehaltes bei Fütterung von Nikotinsäureamid

## Versuchsordnung

Versuch 10: Es wurden ganze Blätter mit einer 0,3 % Nikotinsäureamidlösung gefüttert und im Dunkeln gehalten. Versuchsabbruch nach 96 Stunden. Trigonellingehalt bezogen auf 1g Frischgewicht, Summe aus 3 Proben (Blattpaare 1–3).

Versuch 13: Es wurden Blattscheiben (16 mm  $\varnothing$ ) mit einer 1,0 % Nikotinsäureamidlösung infiltriert und im Dunkeln und Hellen gehalten. Versuchsabbruch nach 48 Stunden. Trigonellingehalt bezogen auf 4 Scheibchen, Summe aus 8 Proben (Blattpaare 1–4).

Versuch 19: Es wurden Blatthälften mit einer 0,3 % Nikotinsäureamidlösung gefüttert und im Dunkeln gehalten. Versuchsabbruch nach 48 Stunden. Trigonellingehalt bezogen auf 10 cm<sup>2</sup> Blattfläche, Summe aus 3 Proben (Blattpaare 1–3).

Alle Pflanzen wurden bei 20 bis 22 °C Temperatur und 70 % bis 100 % Luftfeuchtigkeit gehalten.

Versuch	Trigonellingehalt in Kontrollen mg	Trigonellingehalt in gefütterten Blättern mg	Trigonellin- überschuß mg	Trigonellin- überschuß %
10	3,13	5,29	2,16	69,0
13	1,18	1,59	0,41	34,8
19	0,79	1,25	0,46	58,2
Total	5,10	8,13	3,03	59,4

Teil des Nikotinsäureamids konnte wieder zurückgewonnen werden, während ein verhältnismäßig hoher Prozentsatz nicht mehr zu erfassen war. Der Nikotinsäuregehalt der Blätter stieg nur ganz leicht an. Das spricht weiter dafür, daß die *freie* Nikotinsäure in der Pflanze eine schnell durchlaufene Zwischenstufe ist. (Siehe Tabelle 7.)

In Versuch 10 verwendeten wir 2 gleichaltrige Zweige (a und b) eines Kaffeebaumes, die beide 3 Blattpaare trugen. Je drei aufeinanderfolgende Blätter von Zweig a und b dienten als Kontrollen, während ihre Parallelblätter mit 0,3 % Nikotinsäurelösung (a) beziehungsweise mit 0,3 % Nikotinsäureamidlösung (b) gefüttert wurden. In beiden Fällen bildete sich zusätzlich Trigonellin, wobei das Nikotinsäureamid wirksamer zu sein scheint als die Nikotinsäure. Auf diese Erscheinung weist auch Kühnau (1942) hin, der beim Menschen feststellte, daß nur 60 % der Nikotinsäure, aber 80 %–90 % des Nikotinsäureamids zu Trigonellin umgesetzt werden. (Siehe Tabelle 8.)

Tabelle 8

Trigonellinsynthese bei Fütterung von Nikotinsäure beziehungsweise Nikotinsäureamid  
Auswertung von Versuch 10

Versuchsordnung

Versuch 10: Siehe Tabellen 7 und 10.

Blätter gefüttert mit	Trigonellinüberschuß mg	Trigonellinüberschuß %
Nicotinsäure (a)	1,93	52,3
Nicotinsäureamid (b)	2,16	69,0

Auf Grund unserer Versuche können wir nicht entscheiden, ob die Nikotinsäure physiologisch tatsächlich weniger wirksam ist als ihr Amid oder ob hier das Braunwerden der Blätter eine Rolle spielt.

## VII. Der Einfluß des Lichtes auf die Methylierung der Nikotinsäure und des Nikotinsäureamids zu Trigonellin

Der Einfluß des Lichtes auf die Nikotinsäuresynthese ist von Zeijlmaaker (1953) bei Erbsen und von Crane (1954) bei Tomatenblättern untersucht worden. Die übereinstimmenden Resultate ergeben, daß das



Licht einen fördernden Einfluß auf die Nikotinsäuresynthese ausübt, während der Nikotinsäuregehalt im Dunkeln absinkt.

Unsere Versuche zielten dahin, zu prüfen, welche Wirkung Licht und Dunkel auf den Methylierungsprozeß haben, wenn genügend Nikotinsäure der Pflanze zugeführt wird. Wir verwendeten zu diesen Experimenten ganze Blätter und Blattscheiben. Letztere erwiesen sich als viel günstiger, weil in ihnen das Trigonellin gleichmäßiger auf alle Portionen verteilt ist. Außerdem nehmen sie durch die Infiltration nahezu ebensoviel Lösung auf, während bei Fütterung durch die Mittelrippe die im Hellen gehaltenen Blätter mehr Nährlösung absorbieren.

Die quantitative Auswertung der Experimente lieferte folgende Resultate. (Siehe Tabelle 9.)

Tabelle 9

Trigonellinsynthese in belichteten und verdunkelten Blattscheibchen

Versuchsordnung

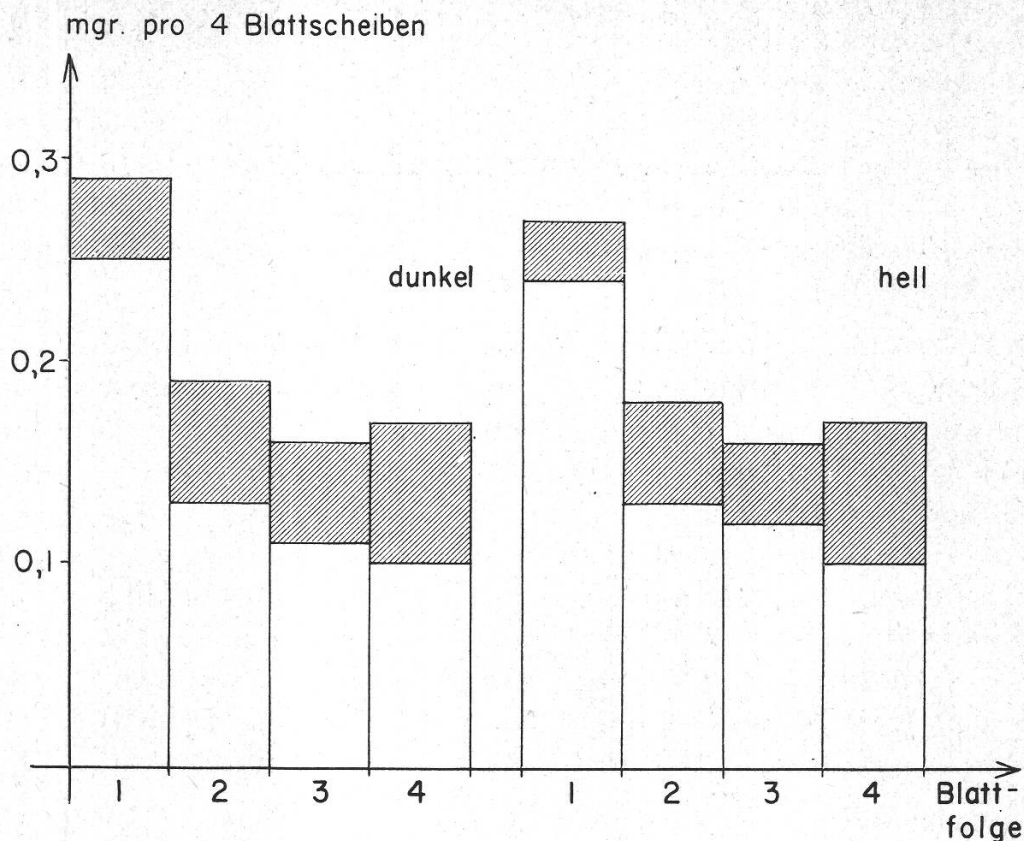
Versuch 4: Siehe Tabelle 7. Trigonellingehalt bezogen auf 4 Blattscheibchen, Summe aus 3 Proben (Blattpaare 1-3).

Versuch 13: Siehe Tabelle 10. Trigonellingehalt bezogen auf 4 Blattscheibchen, Summe aus 4 Proben (Blattpaare 1-4).

Versuch	Dunkel		Hell	
	Trigonellingehalt in Kontrollen mg	Trigonellingehalt in gefütterten Blättern mg	Trigonellingehalt in Kontrollen mg	Trigonellingehalt in gefütterten Blättern mg
4	1,25	1,75	1,25	1,72
13	0,59	0,81	0,59	0,78
Total	1,84	2,56	1,84	2,50

In Versuch 13 stachen wir pro Blattpaar 4 Portionen zu je 4 Scheibchen aus. Je eine mit Nikotinsäureamid-Lösung infiltrierte und eine Kontrollportion wurden zwei Tage im Dunkeln beziehungsweise im Hellen gehalten und hernach analysiert. Die Kontrollen wichen in ihrem Trigonellingehalt nicht voneinander ab, während die gefütterten Scheibchen im Dunkeln eine Spur mehr Trigonellin zu bilden schienen. Der Unterschied von 5% liegt aber innerhalb der Fehlergrenze unserer Methoden und der Variabilität des Materials. (Siehe Figur 9.)

Aus diesen Experimenten kann gefolgert werden, daß innerhalb unserer Versuchszeiten die Belichtung keinen Einfluß auf die Methylierung ausübt. Daraus läßt sich schließen, daß in *Coffea arabica* ein «Vorrat» an labilen Methylgruppen vorhanden ist und diese nicht in der unmittelbar vorangehenden Photosynthese gebildet werden.



Figur 9

Die Trigonellinsynthese in belichteten und verdunkelten Blattscheiben  
Auswertung von Versuch 13

Die weiße Säule gibt den Trigonellengehalt der Kontrollen an, während die darüber stehende schraffierte Säule die Menge des in den infiltrierten Scheiben zusätzlich gebildeten Trigonellins anzeigt

## VIII. Die Bedeutung des Trigonellins im Stoffwechsel von *Coffea arabica*

### 1. Trigonellin reagiert nicht als Methyl-donator

Wie schon in der Einleitung erwähnt, stellte sich bei der Vitaminforschung die Frage, ob Trigonellin im menschlichen Körper zu Nikotinsäure übergeführt würde und so gegen Pellagra wirksam sei. Kühnau (1942) stellte eine Theorie auf, wonach das Trigonellin im Organismus in begrenztem Maße demethyliert werde. Damit komme dem Trigonellin außer seiner Vitaminfunktion eine ähnliche Rolle als Methyl-donator im Intermediärstoffwechsel zu wie dem Cholin und Methionin. Diese These versuchte Kühnau durch Experimente in vivo und an Nierengewebekulturen zu beweisen. Im ersteren Fall erhielt er keine brauchbaren Resultate, im zweiten Fall stellte er eine Demethylierung von 0,1% der beigefügten Trigonellinmenge fest. Daraus schloß Kühnau, daß das Gleich-

gewicht zwischen Nikotinsäure und Trigonellin weit auf der Seite des letzteren liege. Ciusa (1948) widerlegte die Anschauungen von Kühnau durch genaue Experimente, die er in vivo durchführte. Er kam dabei zum Ergebnis, daß das dem Körper zugeführte Trigonellin als solches wieder im Harn ausgeschieden werde. Nach Ciusa lasse auch die chemische Konstitution des Trigonellins es als wenig wahrscheinlich erachten, daß dessen Menthylgruppe labil sei.

Das Resultat von Ciusa gibt jedoch keine allgemein gültige Antwort auf die Frage, ob Trigonellin im Stoffwechsel anderer Organismen demethyliert werde oder nicht. Gewisse Mikroorganismen vermögen Trigonellin an Stelle von Nikotinsäure als Wachstumsfaktor zu verwerten. Dies ist der Fall bei *Torula cremoris* und, wie ein Vorversuch an unserem Institut zeigte, bei *Schizosaccharomyces Pombe*. *Lactobacillus arabinosus* wächst hingegen nur auf Medium mit Nikotinsäurezusatz und reagiert auf Trigonellin nicht. Auf diesen beiden verschiedenen Verhaltensweisen von *Torula cremoris* und *Lactobacillus arabinosus* beruhen die mikrobiologischen Nachweismethoden von Trigonellin und Nikotinsäure (Snell u.a. 1941, Williams 1946).

Es war naheliegend, zu ermitteln, welche Bedeutung dem Trigonellin im Stoffwechsel von *Coffea arabica* zufällt. In erster Linie galt es, herauszufinden, ob das Trigonellin demethyliert wird. Zur Abklärung dieses Problems ist *Coffea* ein günstiges Versuchsobjekt, da die Purinvorstufen des leicht faßbaren Coffeins geeignete Methylakzeptoren darstellen. Die gleichzeitige Analyse des Coffeins und Trigonellins könnte somit Rückschlüsse über eine mögliche Funktion von Trigonellin als Methylendonator für die Coffeinsynthese gestatten.

Zuerst wurde untersucht, ob eine genau bekannte, in Blattscheibchen infiltrierte Menge von Trigonellin nach Ablauf des Versuches wieder auffindbar sei. In sechs Proben gelang es, zusätzlich gefüttertes Trigonellin innerhalb einer Fehlergrenze von 4% wieder zurückzugewinnen. (Siehe Tabelle 10.)

Dieses Resultat ist noch nicht ausreichend, um das Schicksal des Trigonellins in der Pflanze einwandfrei zu erklären.

In Versuch 12, wo das zugeführte Trigonellin quantitativ wieder auffindbar war, wurde ein  $^{14}\text{C}$ -methylmarkiertes Präparat infiltriert, welches gestatten sollte, das Verhalten der  $\text{CH}_3$ -Gruppe und des Trigonellins überhaupt zu verfolgen. Von einem früheren Experiment war der Infiltrationslösung Hypoxanthin beigemischt, welches als Methylempfänger in Frage kommen konnte. Die Blattextrakte wurden chromatographiert und die Chromatogramstreifen im Geiger-Müller-Zähler vom Auftragspunkt bis zur Laufmittelfront durchgemessen. Über dem scharf abgegrenzten Trigonellinflecken stieg die Aktivität steil auf 3500 Impulse/Minute an,



Tabelle 10

## Rückgewinnung von zusätzlich gefüttertem Trigonellin

## Versuchsordnung

Versuch 8: Es wurden Blattscheibchen (16 mm  $\varnothing$ ) mit einer 1,0% Trigonellinlösung infiltriert und im Dunkeln gehalten. Versuchsabbruch nach 24 Stunden. Trigonellengehalt bezogen auf 4 Scheibchen.

Versuch 12: Es wurden Blattscheibchen (16 mm  $\varnothing$ ) mit einer 0,3% Trigonellinlösung infiltriert und im Hellen gehalten. Versuchsabbruch nach 48 Stunden. Trigonellengehalt bezogen auf 8 Scheibchen.

In beiden Versuchen wurden die Blattscheibchen bei einer Temperatur von 20°C in Raum mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre aufbewahrt.

Scheiben aus Blattpaar	<i>a</i> Trigonellengehalt in Kontrollen mg	<i>b</i> Infiltriertes Trigonellin mg	<i>c</i> Trigonellengehalt in infiltrierten Scheiben mg	Differenz aus <i>c - b</i> mg
1 (Vers. 8)	0,48	0,90	1,37	0,47
2 (Vers. 8)	0,35	0,90	1,40	0,50
3 (Vers. 8)	0,41	1,00	1,38	0,38
4 (Vers. 8)	0,33	1,00	1,30	0,30
1 (Vers. 12)	0,56	0,48	1,06	0,58
2 (Vers. 12)	0,49	0,42	0,93	0,51
Total	2,62	4,70	7,44	2,74

während das übrige Chromatogramm und vor allem das Coffein keine radioaktiven Stellen mehr aufwies.

Damit war ein zweiter Beweis dafür erbracht, daß das Trigonellin seine Methylgruppe nicht abgibt und als Ganzes in keine weitere Verbindungen eingebaut oder niedrigere Bestandteile gespalten wird.

Schließlich verglichen wir die absolute Aktivität des gefütterten Trigonellins mit der absoluten Aktivität des nach Versuchsabbruch isolierten Trigonellins. Gleichgültig ob Blattscheibchen infiltriert oder ganze bewurzelte Pflanzen über die zungenartig ausgeschnittene Mittelrippe eines Blattes gefüttert wurden, konnte die gesamte zugeführte Aktivität im Trigonellin wieder gefunden werden. (Siehe Tabelle 11.)

In Untersuchungen, wo die Blattscheiben sich verfärbten und abstarben, wurden die Veränderungen des Trigonellin- und Coffeingehaltes beobachtet. Das Trigonellin verschwand auch unter diesen extremen Bedingungen nicht, während Coffein offenbar zum Teil abgebaut wurde. (Siehe Tabelle 12.)

Damit wäre für die Coffeinabnahme in den älteren Blättern (siehe Kapitel III) eine mögliche Erklärung gegeben.

Tabelle 11

Die absolute Aktivität des infiltrierten beziehungsweise gefütterten und zurückgewonnenen Trigonellins

## Versuchsordnung

Versuch 12: Siehe Tabelle 14.

Versuch 14: Eine ganze Kaffeepflanze wurde über die Mittelrippe mit einer 0,3 % Trigonellin-N-methyl-<sup>14</sup>C-Lösung gefüttert. Die Pflanze wurde belichtet und in Raum mit 70 % Luftfeuchtigkeit bei einer Temperatur von 20 °C gehalten. Versuchsabbruch nach 48 Stunden.

Versuch 17: Junge Kaffeepflanze gefüttert wie in Versuch 14. Pflanze bei zwölfstündigem Tages- und Nachtrhythmus in Raum mit 70 % Luftfeuchtigkeit bei einer Temperatur von 20 °C gehalten. Versuchsabbruch nach 96 Stunden.

Versuch 21: Junge Pflanze gefüttert wie in Versuch 14. Konzentration der Trigonellinlösung 0,25 %. Die Pflanze wurde bei zwölfstündigem Tages- und Nachtrhythmus in Raum mit 70 % Luftfeuchtigkeit bei einer Temperatur von 22 °C gehalten. Versuchsabbruch nach 72 Stunden.

Versuch 22: Analog zu Versuch 21. Versuchsabbruch nach 7 Tagen.

Versuch	Infiltrierte bzw. gefütterte Trigonellinmenge		Rückgewonnene Trigonellinmenge	
	mg	Impulse/Min.	Impulse/Min.	mg
12	0,90	505 000	494 300 →	0,88
14	1,08	599 000	617 840 →	1,11
17	0,82	459 000	455 800 →	0,81
21	0,83	316 000	290 000 →	0,76
22	1,01	386 000	370 600 →	0,97

## 2. Der Transport des Trigonellins

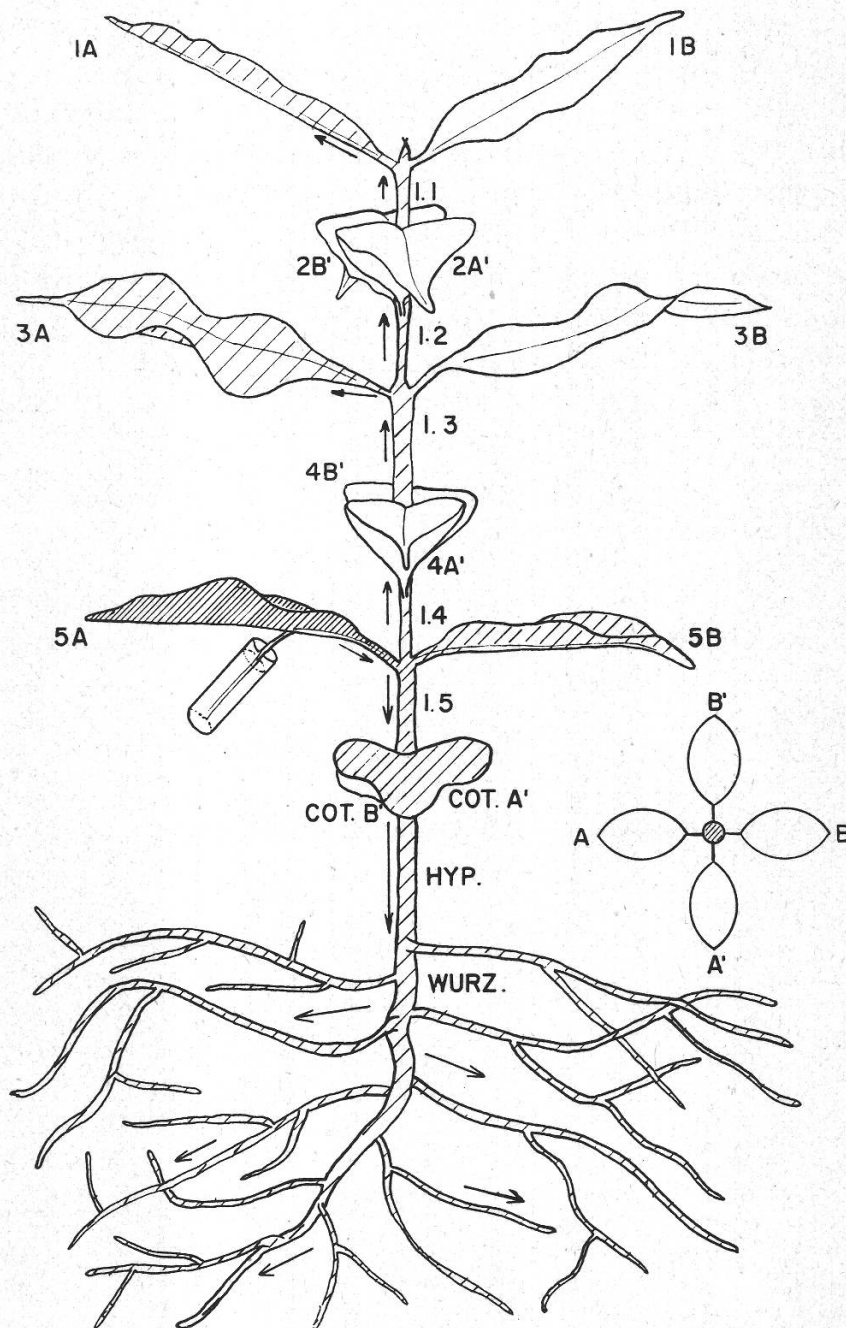
Der Trigonellengehalt fällt von den jüngeren Blättern gegen die älteren noch deutlicher ab, als dies beim Coffein der Fall ist. Da in den bisher

Tabelle 12

Veränderungen des Trigonellin- und Coffeingehaltes bei Absterben des Blattgewebes  
Trigonellengehalt bezogen auf 4 Blattscheiben

Scheiben aus Blattpaar	Trigonellengehalt in Kontrollen mg	Trigonellengehalt in abgestorbenen Blättern mg	Coffeingehalt in Kontrollen mg	Coffeingehalt in abgestorbenen Blättern mg
1	0,41	0,39	0,55	0,33
2	0,27	0,27	0,39	0,26
3	0,21	0,20	0,35	0,32
4	0,19	0,19	0,39	0,33
Total	1,08	1,05	1,68	1,24

beschriebenen Versuchen nie ein Abbau des Trigonellins feststellbar war, kann dessen Verschwinden nur auf Abtransport zurückzuführen sein. Daß ein solcher Trigonellintransport in der Pflanze stattfindet, läßt schon die hohe Trigonellinkonzentration in den Stengeln vermuten. Zum Nachweis



Figur 10

Der Trigonellintransport in einer jungen Kaffeepflanze

Gefüttert wurde die Pflanze durch die ausgeschnittene Mittelrippe des Blattes 5A. Das radioaktive Trigonellin gelangte in alle schraffierten Pflanzenteile. Die Pfeile geben den Wanderungsweg an. (1A/B - 5A/B = Blätter, Cot. A'/B' = Cotyledonen, Hyp. = Hypocotyl, Wurz. = Wurzel)



wurden junge Kaffeepflanzen mit markiertem Trigonellin über die Mittelrippe eines Blattes gefüttert. Nach Versuchsabbruch wurde jedes Blatt, Internodium und die Wurzel gesondert auf die Aktivität des enthaltenen Trigonellins geprüft. So konnte der Transportweg des Trigonellins ermittelt werden.

In Versuch 14 wurde die Pflanze nach 48 Stunden analysiert. Das markierte Trigonellin befand sich nach dieser Zeit noch zur Hauptsache im gefütterten Blatt, war aber auch schon in die unteren Stengelabschnitte und in die Wurzel abgewandert. Eine Spur von markiertem Trigonellin gelangte in das um zwei Etagen höher stehende entsprechende Blatt (3A) sowie in ein Cotyledon (CA'). In Experiment 17 wurde eine analog behandelte gleichaltrige Pflanze nach 96 Stunden analysiert. Das Trigonellin war wieder in die unteren Internodien abtransportiert worden. Eine ganz geringe Menge fand sich auch in Blatt 3A und 1A, welche zwei beziehungsweise vier Etagen höher standen als das gefütterte Blatt 5A. Dies beruht

Tabelle 13  
Der Trigonellintransport in jungen Kaffeepflanzen

Versuchsordnung

Versuch 14: Siehe Tabelle 15. Gefüttert wurde durch die Mittelrippe des Blattes 5A.

Versuch 17: Siehe Tabelle 15. Gefüttert wurde durch die Mittelrippe des Blattes 5A.

Pflanzenteile	Versuch 14 Absolute Aktivität des Trigonellins Impulse/Min.	Versuch 17 Absolute Aktivität des Trigonellins Impulse/Min.
1A	—	932
2A'	—	—
3A	710	533
4A'	—	—
5A	598 000	410 000
Cotyledon A'	450	1310
1B	—	—
2B'	—	—
3B	—	—
4B'	—	—
5B	—	5 730
Cotyledon B'	—	—
I.1	—	266
I.2	—	444
I.3	520	4 890
I.4	890	4 440
I.5	6 950	11 790
Hypocotyl	4 760	5 480
Wurzel	5 560	9 990
Total	617 840	455 805

offenbar auf dem Verlauf der Leitbündel, die bei dekussierter Blattstellung eine Verbindung zwischen gleichstehenden Blättern herstellen. Im Wasser, worin die beiden Pflanzen mit den Wurzeln eingetaucht waren, konnte nach dieser Zeit kein ausgeschiedenes Trigonellin nachgewiesen werden. (Siehe Figur 10, Tabelle 13.)

Da das Trigonellin auch in die oberen Pflanzenteile geleitet wird, stellte sich die Frage, in welchem Maße die neu sich entfaltenden Blätter das Trigonellin von dem unter ihnen stehenden Blattpaar beziehen. In Versuch 22 wurde nach der schon beschriebenen Methode das oberste Blatt 1A mit radioaktivem Trigonellin gefüttert. Nach einer Woche wurde untersucht, welche Menge des aktiven Trigonellins in das neu gewachsene, jüngste Blattpaar gelangt ist. (Siehe Tabelle 14.)

Tabelle 14

Der Transport des Trigonellins in das jüngste Blattpaar

Versuchsordnung

Versuch 22: Siehe Tabelle 15. Gefüttert wurde das Blatt 1A.

Pflanzenteile	Absolute Aktivität des Trigonellins Impulse/Min.	Der absoluten Aktivität entsprechende Trigonellinmenge mg
Jüngstes Blatt	43 900	0,11
Gefüttertes Blatt 1A und Gegenblatt 1B	128 400	0,34
Alle darunterstehenden Blätter, Internodien und Wurzel	198 300	0,52
<i>Total</i>	370 600	0,97

In einem weiteren Experiment wurde abgeklärt, ob das Trigonellin im Xylem oder Phloem transportiert wird. Zu diesem Zweck wurde durch Ringelung am Internodium über und unter dem gefütterten Blatt das Phloem entfernt. Das markierte Trigonellin wanderte trotzdem über die beiden Ringelungen hinaus. Demnach kann das Xylem als Leitungsbahn für den Trigonellintransport in Betracht gezogen werden.

## IX. Methylierungsvorgänge

Im Intermediärstoffwechsel der Pflanzen wirken zur Hauptsache Methionin und Betain als Methyldonatoren (Schröter 1958), während Cholin bis jetzt nur bei *Nicotiana tabacum* als Methylüberträger nachgewiesen werden konnte (Byerrum 1953). In mehreren Experimenten

wurde die Wirksamkeit von Methionin und Betain bei der Methylierung der Nikotinsäure zu Trigonellin geprüft. Da keine  $^{14}\text{C}$ -methylmarkierten Präparate zur Verfügung standen, konnte nur die Mehrausbeute an Trigonellin bei Fütterung eines Methyldonators im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Zugabe von Methyldonatoren gemessen werden.

Das *Methionin* wird durch ATP (Adenosintriphosphat) in S-Adenosylmethionin, ein Sulfoniumsalz, übergeführt und reagiert nur in dieser «aktiven» Form als Methylüberträger (Cantoni 1952). Da wir zu unseren Versuchen nicht über S-Adenosylmethionin verfügten, fütterten wir die Pflanzen mit ATP und L(-)Methionin, welche von Cantoni als Vorstufen beschrieben wurden. In Versuch 15 infiltrierten wir in Blattscheiben eine Lösung von ATP und L(-)Methionin und verglichen den Trigonellengehalt nach 24 Stunden mit den unbehandelten Kontrollen. Es konnte dabei keine Steigerung des Trigonellengehaltes festgestellt werden. (Siehe Tabelle 15.)

Tabelle 15

Der Trigonellengehalt nach der Infiltration von ATP und L(-)Methionin

Versuchsordnung

Versuch 15: Es wurden je 4 Blattscheiben von 16 mm  $\varnothing$  mit einer 0,05 mol Lösung von ATP und L(-)Methionin infiltriert und im Dunkeln in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei einer Temperatur von 20 °C aufbewahrt. Trigonellengehalt bezogen auf 4 Blattscheiben. Versuchsabbruch nach 48 Stunden.

Scheiben aus	Trigonellengehalt der Kontrollscheiben mg	Trigonellengehalt der gefütterten Scheiben mg
Blattpaar 1	0,41	0,41
Blattpaar 2	0,27	0,27
Blattpaar 3	0,21	0,24
Blattpaar 4	0,19	0,19
<i>Total</i>	1,08	1,11

In Versuch 18 wurde untersucht, ob bei einer kombinierten Fütterung von Nikotinsäure, ATP und Methionin mehr Trigonellin gebildet würde als bei der bloßen Fütterung von Nikotinsäure. Zwei Blatthälften eines Blattpaares wurden mit dem Blattstiel in die verschiedenen Lösungen gestellt, während die entsprechenden, der Mittelrippe entlang abgeschnittenen Hälften als Kontrolle dienten. (Siehe Tabelle 16.)

Aus diesem Resultat läßt sich folgern, daß bei Fütterung von ATP und Methionin als Vorstufen des S-Adenosylmethionins keine gesteigerte



Tabelle 16

Die Trigonellinsynthese bei kombinierter Fütterung von Nikotinsäure, ATP und Methionin

## Versuchsordnung

Versuch 18: Es wurden Blatthälften mit 0,3 % Nikotinsäure beziehungsweise mit 0,3 % Nikotinsäure und einer 0,05 mol Lösung von ATP und L(-)Methionin gefüttert und im Hellen in Raum mit 70 % Luftfeuchtigkeit bei einer Temperatur von 20 °C aufbewahrt. Versuchsabbruch nach 48 Stunden. Trigonellingehalt bezogen auf 10 cm<sup>2</sup> Blattfläche.

Blatthälften aus	Zusätzlich gebildetes Trigonellin nach Fütterung von Nikotinsäure mg	Zusätzlich gebildetes Trigonellin nach Fütterung von Nikotinsäure, ATP und Methionin mg
Blattpaar 1	0,29	0,26
Blattpaar 2	0,16	0,28
Blattpaar 3	0,16	0,12
<i>Total</i>	0,61	0,66

Trigonellinsynthese stattfindet. Damit ist aber noch nicht abgeklärt, ob fertig synthetisiertes S-Adenosylmethionin ebenfalls unwirksam ist.

In allen Versuchen, bei denen Adenin oder Adenosin chromatographiert wurde, verwendeten wir das Laufmittel C (Butanol-Ammoniak-Wasser, 100:2:16).

Tabelle 17

Die Trigonellinsynthese bei kombinierter Fütterung von Nikotinsäureamid und Betain

## Versuchsordnung

Versuch 19: Es wurden Blatthälften mit einer Lösung von 0,3 % Nikotinsäureamid beziehungsweise 0,3 % Nikotinsäureamid und Betainchlorid gefüttert und im Dunkeln in Raum mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei einer Temperatur von 22 °C aufbewahrt. Versuchsabbruch nach 48 Stunden. Trigonellingehalt bezogen auf 10 cm<sup>2</sup> Blattfläche, Summe aus 3 Proben (Blattpaar 1-3).

Versuch 20: Analog zu Versuch 19. Trigonellingehalt bezogen auf 10 cm<sup>2</sup> Blattfläche, Summe aus 4 Proben (Blattpaar 1-4). Es wurden chlorotische Blätter verwendet, die normalerweise nur noch geringe Methylierungsfähigkeit aufweisen.

Versuch	Zusätzlich gebildetes Trigonellin nach Fütterung von Nikotinsäure mg	Zusätzlich gebildetes Trigonellin nach Fütterung von Nikotinsäure und Betain mg
19	0,46	0,58
20	0,14	0,47

In Experiment 19 und 20 wurde die Wirksamkeit von *Betain* auf die Methylierung der Nikotinsäure geprüft. Analog zu Versuch 18 wurden zwei Blatthälften eines Blattpaares mit Nikotinsäureamid beziehungsweise mit Nikotinsäureamid und Betainchlorid gefüttert. Die entsprechenden, vor Versuchsbeginn abgeschnittenen Blatthälften lieferten die Kontrollwerte. (Siehe Tabelle 17.)

Dieses Ergebnis entspricht den Befunden von Byerrum u.a. (1956), die das Betain als wirksamen Methyldonator bei der Nikotinsynthese ermittelt haben.

## X. Beziehungen zwischen der Coffein- und Trigonellinsynthese

Sowohl das Trigonellin als auch das Coffein sind methylierte Produkte des sekundären pflanzlichen Stoffwechsels. Kremers (1954) stellte eine These auf, nach der das Coffein nicht durch Abbau der Nukleotide und Nukleoside entstehe, sondern gemeinsam mit Trigonellin aus dem DPN (Diphosphopyridinnukleotid) gebildet werde. Als Beweis für diese These führt Kremers die Ähnlichkeit der Abbaumechanismen an, die zu Coffein und Trigonellin führen, und stellt dafür folgendes Schema auf.

- |                    |                            |                                 |
|--------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 1. Hydrolyse:      | DPN                        | → Nikotinsäureamid<br>→ Adenin  |
| 2. Desaminierung:  | Nikotinsäureamid<br>Adenin | → Nikotinsäure<br>→ Hypoxanthin |
| 3. Oxydation:      | Hypoxanthin                | → Xanthin                       |
| 4. N-Methylierung: | Nikotinsäure<br>Xanthin    | → Trigonellin<br>→ Coffein      |

Tabelle 18

Der Coffein- und Trigonellengehalt in den Bohnen verschiedener Kaffeesorten  
(a–d nach Kogan, e nach Kremers und f, g nach Hadorn)

Sorte	Coffeingehalt in mg% des Trockengewichts	Trigonellengeh. in mg% des Trockengewichts	Molares Gewichts- verhältnis Coffein: Trigonellin
a Santos (grün)	1,09	1,01	0,77
b Columbia (grün)	1,21	0,62	1,38
c Bukoba (grün)	2,05	0,52	2,79
d Brand A (geröstet)	1,30	0,80	1,16
e Guatemala	1,15	1,01	0,81
f Belg.-Kongo	1,99	0,74	1,91
g Costa Rica	1,14	0,84	0,97



Ferner sei nach Kremers das molare Gewichtsverhältnis des Coffein- und Trigonellingehaltes in Kaffeebohnen immer äquivalent, was wiederum auf den gemeinsamen Ursprung der beiden Stoffe hindeute. Eine Überprüfung dieser Aussage anhand eines Zahlenmaterials aus den Arbeiten von Kogan u.a. (1953), Kremers (1954) und Hadorn u.a. (1956) ergab folgendes Bild. (Siehe Tabelle 18.)

Diese Zusammenstellung zeigt, daß das Verhältnis zwischen Coffein- und Trigonellengehalt weitgehend von der Sorte abhängig ist und daß keine molare Äquivalenz besteht. Ähnliche Berechnungen können für den Coffein- und Trigonellengehalt von Kaffeeblättern nicht angestellt werden, da das Trigonellin ständig abtransportiert wird. Dieser Umstand müßte vielleicht auch bei den Bohnen berücksichtigt werden.

In einem eigenen Versuch fütterten wir ganze Kaffeeblätter mit DPN und Betain als Methyl-donator. Wie erwartet fand eine zusätzliche Trigonellinsynthese statt. Der Coffeingehalt stieg demgegenüber nur unwesentlich an. (Siehe Tabelle 19.)

Tabelle 19

Trigonellin- und Coffeinsynthese bei Fütterung von DPN und Betain

Versuchs-anordnung

Versuch 23: Ganze Blätter wurden mit einer Lösung von 0,1 % DPN und Betainchlorid gefüttert und bei zwölfstündigem Tages- und Nachtrhythmus in Raum mit 70 % Luftfeuchtigkeit bei einer Temperatur von 22 °C aufbewahrt. Versuchsabbruch nach 72 Stunden. Trigonellengehalt bezogen auf 1g Frischgewicht, Summe aus 3 Proben (Blatt-paar 1-3).

Trigonellengehalt in Kontrollblättern mg	Trigonellengehalt in gefütterten Blättern mg	Coffeingehalt in Kontrollblättern mg	Coffeingehalt in gefütterten Blättern mg
3,54	4,82	5,98	6,48

Laufende Versuche von Wanner und Mitarbeitern am Institut für allgemeine Botanik der Universität Zürich ergaben, daß nicht nur das Adenin und das Adenosin, sondern auch die anderen Purinbasen und insbesondere deren Riboside Vorstufen des Coffeins sein können. Dies spricht weiter gegen die Annahme, wonach das Coffein ausschließlich aus dem DPN gebildet wird. Vielmehr ist es wahrscheinlich, daß es ein Ausscheidungsprodukt des gesamten Purinstoffwechsels ist.



## XI. Diskussion

Es gibt keinen einheitlichen Weg der *Nikotinsäuresynthese*. Neben den bisher bekannten Möglichkeiten über den Aminosäurestoffwechsel muß auch der Aufbau des Pyridinringes aus niederen Verbindungen ins Auge gefaßt werden. Zur Abklärung des Problems wäre es empfehlenswert, Pflanzen, bei denen weder Tryptophan, Prolin noch Ornithin Vorstufen des Pyridinringes sind, mit niederen, radioaktiv markierten Verbindungen zu füttern. Durch die Analyse des leicht faßbaren Trigonellins könnte ermittelt werden, ob die zugeführten Substanzen in den Ring eingebaut werden. Die gefütterte Nikotinsäuremenge wird auf Grund unserer Ergebnisse bei *Coffea arabica* nicht gesamthaft methyliert, wie dies bei *Pisum sativum* und *Zea Mays* der Fall ist. Die überschüssige Nikotinsäure wird offenbar abgebaut oder zur Biosynthese anderer Stoffe verwendet. In diesem Zusammenhang verglichen wir den Aminosäuregehalt von Extrakten aus Blättern, die mit Nikotinsäure gefüttert wurden, mit den entsprechenden unbehandelten Kontrollen. Zumindest das Alanin trat nach Nikotinsäurefütterung in erhöhter Konzentration auf. Es ist jedoch ungewiß, ob diese Anhäufung direkt durch Nikotinsäure- oder indirekt durch gesteigerten Proteinabbau verursacht wird.

Da die Nikotinsäure in freier Form auf das Gewebe toxisch wirkt, scheint die Annahme von Mothes (1960) berechtigt, wonach die Methylierung zu *Trigonellin* als eine Entgiftung zu betrachten sei. Analog dazu konnten wir feststellen, daß freie Purinbasen in höherer Konzentration das Blattgewebe bräunen, während Theophyllin und Coffein als Methylxanthine unschädlich sind. Für den Nachweis, welche Methylendonatoren bei der Methylierung der Nikotinsäure wirksam sind, benötigte man  $^{14}\text{C}$ -methylmarkierte Substanzen. Unsere einfachen Versuche zeigten, daß Betain die Trigonellinsynthese steigert. In erster Linie läßt sich bei älteren und physiologisch inaktiven Blättern eine Regeneration der Methylierungsfähigkeit erzielen.

Bei gewissen Mikroorganismen und während der Keimung (Blaim 1960) wird Trigonellin wieder in Nikotinsäure übergeführt, wobei aber das Schicksal der  $\text{CH}_3$ -Gruppe gänzlich unbekannt ist. Trotz dieser Demethylierung hat Trigonellin im Intermediärstoffwechsel sicher nicht dieselbe Bedeutung als Methylendonator wie Cholin oder Betain. Dafür sprechen einerseits unsere Versuche, die den Beweis erbracht haben, daß in älteren Kaffeepflanzen das Trigonellin seine Methylgruppe nicht abgibt. Andererseits ist die chemische Struktur des Trigonellins nicht mit derjenigen der aliphatischen quaternären Ammoniumbasen Cholin und Betain zu vergleichen, bei denen nach Leuthardt (1955) wahrscheinlich nur eine der  $\text{CH}_3$ -Gruppen biologisch labil ist. Die entsprechenden tertiären Amine (Dimethylaminoäthylalkohol, Dimethylglykokoll oder Sarkosin) geben ihre Methylgruppen nicht oder jedenfalls nur langsam ab. Auf-

schlußreich in dieser Beziehung mögen die Untersuchungen von Schomaker und Pauling (1939) sein, aus denen gefolgert werden kann, daß die Methylgruppe des Trigonellins fest an den Stickstoff des Pyridinringes gebunden ist.

Das Trigonellin wäre nach alledem ein Nebenprodukt des Nikotinsäurestoffwechsels, dem in den Blättern und gemäß den Ergebnissen von Ciusa (1948) auch im menschlichen und tierischen Organismus keine stoffwechselphysiologische Bedeutung zukommt. Anders mögen die Verhältnisse in Meristemen liegen, wo das Trigonellin in manchen Fällen in Nikotinsäure übergeführt wird.

Das Trigonellin wird aus den Blättern abtransportiert, während das Verschwinden des Coffeins auf Abbau zurückzuführen ist.

## XII. Zusammenfassung

1. Es wurden eine nach Kogan u.a. (1953) veränderte Methode zur quantitativen Bestimmung des Coffeins, Trigonellins, der Nikotinsäure und des Nikotinsäureamids in Kaffeeblättern sowie verschiedene Fütterungsmethoden beschrieben. Ferner gaben wir ein Schema an, nach dem vier Portionen von Blattscheibchen gewonnen werden können, die in bezug auf den Coffein- und Trigonellingehalt homogen sind.
2. Der Coffeingehalt nimmt von den jüngeren Kaffeeblättern gegen die älteren ab. Die oberen Internodien junger Pflanzen enthalten ein wenig Coffein, während die unteren und die Wurzel gänzlich coffeinfrei sind. Der Trigonellingehalt fällt von den jüngsten Blättern gegen die älteren noch steiler ab, als dies beim Coffein der Fall ist. Stengel und Wurzel enthalten reichlich Trigonellin.  
Freie Nikotinsäure liegt in den Kaffeeblättern in äußerst geringer Konzentration vor und konnte mit unserer papierchromatographischen Methode nicht erfaßt werden.
3. Tryptophan, Prolin und Ornithin konnten *nicht* als Vorstufen der Nikotinsäure nachgewiesen werden.
4. Nikotinsäure schädigt das Blattgewebe. Die zugeführte Nikotinsäuremenge wird zu einem großen Teil (>50%) in unbekannter Weise chemisch verändert und ist nicht mehr auffindbar. Der Rest wird zu Trigonellin methyliert oder läßt sich wieder isolieren.
5. Nikotinsäureamid wirkt selbst in höheren Konzentrationen auf das Blattgewebe nicht toxisch. Die Trigonellinausbeute ist verglichen mit Versuchen, wo Nikotinsäure gefüttert wurde, höher.
6. Belichtung und Verdunkelung haben auf die Methylierungsfähigkeit der Blätter innerhalb unserer Versuchszeiten (48 h) keinen Einfluß.



7. a) Das Trigonellin reagiert in der Kaffeepflanze *nicht* als Methyl-dona-tor. Zum Nachweis wurde Trigonellin-N-methyl-<sup>14</sup>C gefüttert, welches nach 2, 4 und 7 Tagen gesamthhaft wieder zurückgewonnen werden konnte. Somit wird das Trigonellin im Stoffwechsel von *Coffea arabica* in keiner Weise mehr verändert.  
 b) Das Trigonellin wird aus den Blättern in die unteren und oberen Pflanzenteile abtransportiert. Der Transportweg ließ sich durch Verwendung von markiertem Trigonellin verfolgen.
8. Die Methylierungsfähigkeit der Kaffeepflanzen wurde durch zusätzliche Fütterung von L(-)Methionin und ATP als Vorstufen des S-Adenosylmethionins nicht gesteigert. Hingegen erwies sich Betain als wirksam, da es die Trigonellinausbeute erhöhte.
9. Zwischen dem Trigonellin- und Coffeingehalt in Bohnen verschiedener Kaffeesorten gibt es keine molare Äquivalenz. Deswegen kann das DPN nicht als ausschließliche Ursprungssubstanz des Coffeins betrachtet werden. Bei Fütterung von DPN stieg der Trigonellingehalt in Kaffeeblättern erwartungsgemäß, der Coffeingehalt jedoch nur schwach an.

### Summary

1. A method for the quantitative determination of caffeine, trigonelline, nicotinic acid, and nicotinamide in coffee leaves as well as various methods of feeding were described. Further a procedure to obtain four homogenous portions of leaf discs containing equal quantities of caffeine and trigonelline was indicated.
2. The content of caffeine decreases in proportion to the age of the coffee leaves. The upper internodes of young plants contain little caffeine, while the lower internodes and the root contain none at all. The content of trigonelline decreases still more rapidly from the youngest towards the oldest leaves than the content of caffeine. Stalk and root are rich in trigonelline.  
 The coffee leaves contain an extremely small proportion of free nicotinic acid which could not be registered by our paper-chromatographic method.
3. Tryptophane, proline, and ornithine could not be proved to be preliminary stages of nicotinic acid in *Coffea arabica*.
4. Nicotinic acid has a toxic effect on the leaf tissue. More than 50% of the supplied quantity of niacin underwent a chemical transformation due to an unknown reaction and could no more be traced. The rest was methylated into trigonelline or can be isolated again.



5. Nicotinamide, even in greater concentrations, has no toxic effect on the leaf tissue. The trigonelline yield was higher compared with experiments where nicotinic acid had been added.
6. Exposure to light or darkness had no effect on the capacity of methylation of the leaves within the time limits of the experiments in question (48 h).
7. a) Trigonelline does *not* react as methyl donor in the coffee plant. As a proof, trigonelline-N-methyl-<sup>14</sup>C was added and could be extracted again full after two, four, and seven days. Thus, trigonelline is in no way altered in the metabolism of *Coffea arabica*.  
b) Trigonelline is transported from the leaves to the upper and lower parts of the plant. The process could be followed by use of <sup>14</sup>C-labelled trigonelline.
8. The capacity of methylation of the coffee plant was not intensified by additional feeding of L(-)methionine and ATP as preliminary stages of S-adenosylmethionine. Betaine, however, proved to be efficient, since it increased the synthesis of trigonelline.
9. There is no molar equivalence between the content of trigonelline and caffeine in different kinds of coffee beans. DPN cannot therefore be regarded as the exclusive precursor of caffeine. When DPN was added, the content of trigonelline in the coffee leaves increased as was expected, whereas the content of caffeine increased only slightly.

#### Literaturverzeichnis

- Ackermann D.: Über das Vorkommen von Trigonellin und Nikotinursäure im Harn nach Verfütterung von Nikotinsäure. *Z. f. Biol.*, **59**, 17–22 (1912).
- Adamo G.: Trigonelline and niacin in coffee, tea and cocoa. *Ann. chim. (Roma)*, **45**, 274–278 (1955a).
- The nicotinic acid content in coffee. *Boll. soc. ital. biol. sper.*, **31**, 79–82 (1955b).
- Aronoff S.: Experiments of the biogenesis of the pyridine ring in higher plants. *Plant Physiology*, **31**, 355–357 (1956).
- Beadle G. W., Mitchell H. K., Nyc J. F.: Kynurenine as an intermediate in the formation of nicotinic acid from tryptophane by *Neurospora*. *Proc. Nat. Ac. Sc.*, **33**, 155–158 (1947).
- Belosersky A. N., Proskurjakow N. I.: *Praktikum der Biochemie der Pflanzen*. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin, S. 305–309 (1956).
- Blaim K.: Der Abbau von Trigonellin zu Nikotinsäure in keimenden Samen. *Naturwissenschaften*, **14**, 332 (1960).
- Blake C. O.: Niacin metabolism in the corn seedling: The biosynthesis of trigonelline. *Am. J. Botany*, **41**, 231–238 (1954).
- Bonner D. M., Wassermann E.: The conversion of <sup>15</sup>N containing indole to niacin by niacin requiring strain 39401 of *Neurospora*. *J. Biol. Chem.*, **185**, 69 (1950).
- Byerrum R. U., Wing R. E.: The role of choline in some metabolic reactions of *Nicotiana rustica* L. *J. Biol. Chem.*, **205**, 637–642 (1953).
- Sato C. S., Ball C. D.: Utilization of betaine as a methyl group donor in tobacco. *Plant Physiology*, **31**, 374–377 (1956).

- Cantoni G.L.: The nature of the active methyl donor formed enzymatically from L-methionine and ATP. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2942–2943 (1952).
- Ciusa W.: La trigonellina e la trigonellineamide non si comportano «in vivo» come sostanze donatrici di metili. *Acta Vitaminologica*, **1**, 1–5 (1948).
- Crane F.L.: A light activated accumulation of niacin in tomato leaf disks. *Plant Physiology*, **29**, 188–190 (1954).
- Dalgliesh C.E.: Biological degradation of tryptophane. *Quart. Rev. Chem. Soc. Lond.*, **5**, 227–244 (1951).
- Euler H. v., Högberg B., Karrer P., Salomon H., Ruckstuhl H.: Tetrahydronicotinsäure und Hexahydronicotinsäure als Wachstumsfaktoren bei *Staphylococcus aureus* und *Bacillus Proteus vulgaris*. *Helv. chim. acta*, **27**, 382–390 (1944).
- Grimshaw J., Marion L.: The pyridine ring and the problem of its biogenesis. *Nature*, **181**, 112 (1958).
- Guggenheim M.: Die biogenen Amine. Verlag S. Karger Basel, 4. Aufl., S.260 (1951).
- Gustafson F.G.: Tryptophane as an intermediate in the synthesis of nicotinic acid by green plants. *Science*, **110**, 279–280 (1949).
- Hadorn H., Suter H.: Über die Analyse und Zusammensetzung von Rohkaffee und verschiedener Provenienzen. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittelforschung und Hygiene*, **47**, 33–51 (1956).
- Hankes L. V., Univertsky M.: Mammalian conversion of <sup>14</sup>C-carboxyl-labeled 3-hydroxyanthranilic acid into N-methylnicotinamide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **52**, 484–485 (1954).
- Heidelberger Ch., Gullberg M.E., Morgan A.F., Lepkovsky S.: Concerning the mechanism of the mammalian conversion of tryptophane into kynurenine, kynurenic acid, and nicotinic acid. *J. Biol. Chem.*, **175**, 471–472 (1948).
- Jahns E.: Über die Alkaloide des Bockshornsamens. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **18**, 2518–2523 (1885).
- Klein G., Linser H.: Zur Bildung der Betaine und der Alkaloide in der Pflanze. I. *Z. physiol. Chem.*, **209**, 75–96 (1932).
- Knox W.E., Mehler A. H.: The conversion of tryptophane to kynurenine in the liver. I. The coupled tryptophane peroxydase-oxydase system forming formylkynurenine. *J. Biol. Chem.*, **187**, 419 (1950).
- Kogan L., DiCarlo F.J., Maynard W.E.: Determination of caffeine and trigonelline in coffee by paper chromatography. *Anal. Chem.*, **25**, 1118–1120 (1953).
- Kramer F.: *Papierchromatographie*. Verlag Chemie GmbH, Weinheim (1958).
- Kremers R.E.: Speculation on DPN as a biochemical precursor of caffeine and trigonelline in coffee. *J. Am. Pharm. Assoc.*, **43**, 423–424 (1954).
- Kühnau J.: Zur Kenntnis des Trigonellins und seiner Beziehungen zum Pellagravitamin, Vitamine und Hormone, **3**, 74–88 (1942).
- Leete E., Marion L., Spencer J.D.: The biogenesis of alkaloids. XIV. Biosynthesis of damascinine and trigonelline. *Can. J. Chem.*, **33**, 405–410 (1955).
- Biogenesis of the pyridine ring of nicotine. *Chem. and Ind.*, 1270 (1957).
- Leifer E., Langham W.H., Nyc J.F., Mitchell H. K.: The use of isotopic nitrogen in a study of the conversion of 3-hydroxyanthranilic acid to nicotinic acid in *Neurospora*. *J. Biol. Chem.*, **184**, 589–592 (1950).
- Leuthardt F.: *Lehrbuch der physiologischen Chemie*. Verlag Walter de Gruyter & Co., 12. Aufl., S. 380 (1955).
- Linskens H.F.: *Papierchromatographie in der Botanik*. Springer-Verlag, 2. Aufl. (1959).
- Mitchell H.K., Nyc J.F.: Hydroxyanthranilic acid as a precursor of nicotinic acid in *Neurospora*. *Proc. Nat. Ac. Sc.*, **34**, 1 (1948a).
- — Owen R.D.: Utilization by the rat of 3-hydroxyanthranilic acid as a substitute for nicotinamide. *J. Biol. Chem.*, **175**, 433–438 (1948b).

- Moore R.G., Greninger D.M.: Determination of trigonelline in coffee. *Anal. Chem.*, **23**, 327-331 (1951).
- Mothes K.: Die Vakuuminfiltration im Ernährungsversuch. (Dargestellt an Untersuchungen über die Assimilation des Ammoniaks). *Planta*, **19**, 117-138 (1933).
- Alkaloids in the Plant. R.H.F. Manske: *The Alkaloids*. Academic Press N.Y.-Lond. Vol. VI, S.1-29 (1960).
- Nason A.: Existence of a tryptophane-niacin relationship in corn. *Science*, **109**, 170 (1949).
- Paech K., Tracey M.V.: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*. Springer-Verlag, Bd. IV, S.301-302 (1955).
- Partridge C.W.H., Bonner D.M., Yanofsky C.: A quantitative study of the relationship between tryptophane and niacin in *Neurospora*. *J. Biol. Chem.*, **194**, 269 (1952).
- Perlzweig W.A., Bernheim M. L. C., Bernheim F.: The methylation of nicotinamide by rat in liver in vitro. *J. Biol. Chem.*, **150**, 401-406 (1943).
- Schomaker V., Pauling L.: The electron diffraction investigation of the structure of benzene, pyridine, pyrazine, butadiene-1, 3, cyclopentadiene, furane, pyrrole, and thiophene. *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 1769-1780 (1939).
- Schormüller J., Feuersenger M.: Über den Nikotinsäure- und Trigonellingehalt der Blätter verschiedener Wildpflanzen. *Dtsche. Lebensmittelrundschau*, **3**, 49-53 (1952).
- Schröter H.B.: *Methylierungsvorgänge am Stickstoff*. Handbuch der Pflanzenphysiologie, Springer-Verlag, Bd. VIII, S.872 (1958).
- Snell E.E., Wright L.D.: A microbiological method for determination of nicotinic acid. *J. Biol. Chem.*, **139**, 675-686 (1941).
- Weevers Th.: Die Funktion der Xanthinderivate im Pflanzenstoffwechsel. *Arch. néerl. des Sci. Ex. et Nat.*, **5**, 111 (1930).
- Williams W.L.: Yeast microbiological method for determination of nicotinic acid. *J. Biol. Chem.*, **166**, 397-406 (1946).
- Yanofsky C.: The absence of a tryptophane-niacin relationship in *E. coli* and *B. subtilis*. *J. Bacter.*, **68**, 577-584 (1954).
- Zeijlemaker F.C.J.: The metabolism of nicotinic acid in the green pea and its connection with trigonelline. *Acta Bot. Neerl.*, **2**, 123-143 (1953).