

17. Die Fermentwirkungen der Ascorbinsäure (Vitamin C)

von G. Woker und J. Antener.

(30. XII. 36.)

Da der Ascorbinsäuregehalt der rohen Milch u. a. auch durch die Entfärbung von Methylenblau ermittelt wird, lag die Frage nahe, ob Beziehungen zwischen der Entfärbung des Methylenblaus durch Ascorbinsäure und der Entfärbung des Methylenblaus durch das *Schardinger*'sche Milchenzym bestehen, welches bekanntlich auf die nämliche Weise ermittelt wird. Mit anderen Worten: Ist für die Entfärbung des Methylenblaus die reduktive Komponente zweier Redoxsysteme, eines bekannten, der Ascorbinsäure und eines unbekanntes, des *Schardinger*'schen Milchenzyms, verantwortlich zu machen, oder ist einzig die Ascorbinsäure Trägerin der Reduktionswirkung? Die letztere Auffassung bedeutet dementsprechend die Zurückführung des *Schardinger*'schen Milchenzyms auf das in seiner Konstitution als Ascorbinsäure erkannte Vitamin C. Ferment- und Vitaminbegriff würden also hier zusammenfallen und wären, der eine wie der andere, an eine chemisch wohl definierte Substanz gebunden.

In ihrer ursprünglichen Ausführung wird die Ermittlung des *Schardinger*'schen Enzyms an formaldehydhaltiger Methylenblaulösung (5 cm³ gesättigte alkoholische Methylenblaulösung, 190 cm³ Wasser und 5 cm³ Formalin 38%) vorgenommen. Sie ist als Ermittlung eines Eigenzyms der rohen Milch zu betrachten.

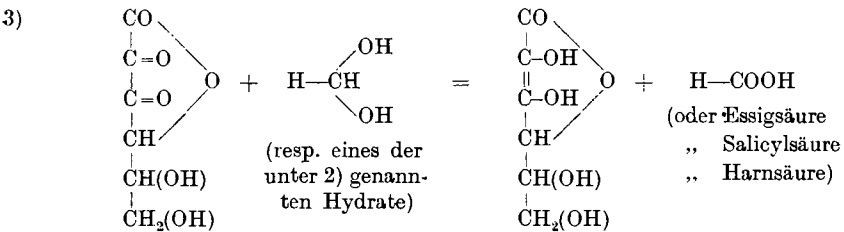
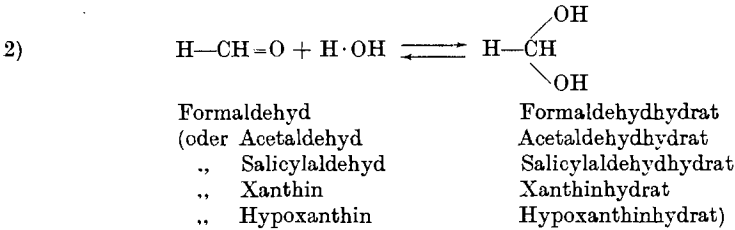
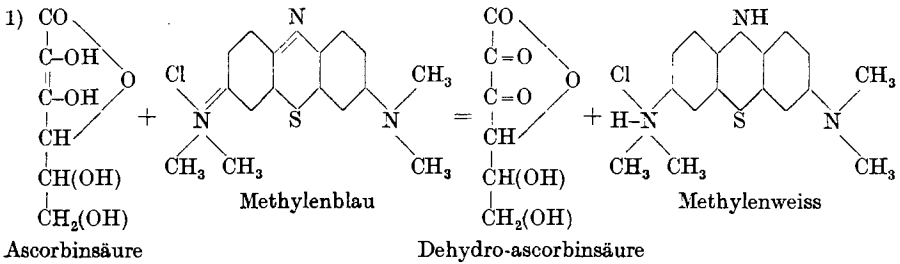
Entsprechend den Untersuchungen von *Sbarsky* und *Michlin*¹⁾ lässt sich der Formaldehyd durch Acetaldehyd, Salicylaldehyd, Xanthin, Hypoxanthin und Eiweissabbauprodukte ersetzen, wodurch der ursprüngliche Begriff des *Schardinger*'schen Enzyms eine wesentliche Erweiterung erfährt. Denn Fermente, wie sie unter anderem als „Essigsäurebakterien-oxydase“, als Salicylase, als Xanthinoxydase usf. beschrieben worden sind, lassen sich einfach dem oxydativen Teileffekt dieses Oxydo-Reduktionszyms subsumieren, durch dessen Vorhandensein dem System der Charakter eines fermentativen Kreisprozesses aufgeprägt wird.

Liegt Methylenblaulösung allein vor, so erlangt die Milch die Befähigung zu ihrer Reduktion, entsprechend der mit dem Alter zunehmenden Bakterienentwicklung, da die Bakterienreduktase hier als das den Kreisprozess schliessende Agens fungiert.

Da unser, allerdings erst als Vorversuch zu wertender Vergleich des Verhaltens von roher und mit Ascorbinsäure versetzter, ge-

¹⁾ *Sbarsky* und *Michlin*, Bioch. Z. 155, 485 ff. (1925).

kochter Milch gegenüber der Formalin-Methylenblaulösung, wenigstens qualitativ keinen Unterschied erkennen liess, so hat es in der Tat den Anschein, als sei die Ascorbinsäure, das Vitamin C, mit dem *Schardinger*'schen Enzym der rohen Milch zu identifizieren. Immerhin behalten wir uns vor, sowohl an der ursprünglichen *Schardinger*'schen Formalin-Methylenblaulösung, wie an den analogen Systemen des Methylenblau und anderen Acceptoren (z. B. Nitraten) mit Acetaldehyd, Salicylaldehyd, Xanthin und Hypoxanthin die Identitätsfrage an Hand der Ergebnisse der quantitativen Verhältnisse genau zu prüfen. Unter diesem Vorbehalt möchten wir für die fermentative Oxydo-Reduktionsfunktion der Ascorbinsäure die folgende Formulierung ins Auge fassen.



Dehydro-ascorbinsäure + Formaldehydhydrat = Ascorbinsäure + Ameisensäure.

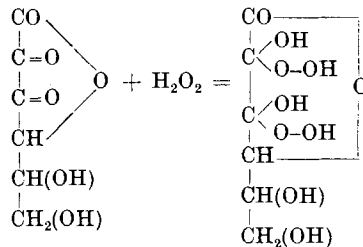
An Stelle eines der nach Gleichung 3 die Ascorbinsäure zurückbildenden Hydrates, tritt bei der alternden Milch die Reduktionskraft der Bakterien. Wie sich der Wasserstoffdonator, der die Dehydro-ascorbinsäure wieder in die reduzierende Ascorbinsäure zurückverwandelt, in der mannigfachsten Weise variieren lässt, so auch der Acceptor, demgegenüber sich der Reduktionseffekt der Ascorbinsäure betätigt.

Wir haben bisher, ausser dem Methylenblau, erst einen Acceptor, den Schwefel, geprüft und konnten in der Tat durch zugesetzte Bleiacetatlösung, sowie, bei anderen Proben, an in das Reagenzglas eingehängten Bleiacetatpapierstreifen, eine allmählich zunehmende Braunfärbung und am Schwefelbodensatz einen Schwefelbleisaum feststellen.

Eine der typischsten Hydrogenasewirkungen, die Schwefelwasserstoffbildung aus Schwefel, wird also ebenfalls von der Ascorbinsäure erzielt. Auch hier dürften wiederum die quantitativen Verhältnisse entscheiden, ob wir berechtigt sind, die Ascorbinsäure selbst als Hydrogenase oder lediglich als Modell der reduzierenden fermentativen Prinzipien anzusprechen.

Wie die Ascorbinsäure primär zu reduktiven Wirkungen befähigt ist, so könnte die autoxydativ, mit Luftsauerstoff, oder in Berührung mit Oxydationsmitteln, bis zu einem Gleichgewicht, aus ihr gebildete Dehydro-ascorbinsäure ihrerseits zu direkten Oxydationsleistungen, auch ausserhalb des oxydo-reduktiven Kreisprozesses, befähigt sein.

Ferner ist mit der Bildung sekundärer Peroxyde durch Anlagerung von Wasserstoffperoxyd an eine oder beide Carbonylgruppen der Dehydro-ascorbinsäure und dementsprechend mit Peroxydasewirkungen zu rechnen:



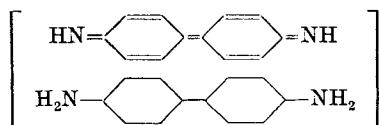
Auch solche Wirkungen sind unter Bedingungen realisierbar, bei denen die, die Oxydationsprodukte im Moment ihres Entstehens angreifende Ascorbinsäure mehr oder weniger ausgeschaltet ist. So lassen sich, sowohl aus autoxydierten als auch aus mit Methylenblau versetzten Ascorbinsäurelösungen Kapillarisationfelder auf Filterpapier erzeugen, die, in ungleich weit vom Zentrum entfernte Zonen zerschnitten, Gemische von 1/2-proz. Wasserstoffperoxyd mit Benzidinhydrochlorid, mit p-Phenylendiamin-Trikresol, mit Leukomalachitgrün oder mit Pyrogallol in ganz verschiedener Weise zu beeinflussen vermögen. Ebenso zeigt sich beim Übergiessen der Kapillarisationfelder mit Wasserstoffperoxyd und Benzidin oder mit verdünnten p-Phenylendiamin-Trikresol-Gemischen neben einem intensiv oxydativ gefärbten zentralen Feld und einer gefärbten Rand-

zone, eine farblose, der Ascorbinsäure entsprechende Zone, genau so, wie sie *Grüss*¹⁾ für Kapillarisationen aus Pflanzenmaterial als „Antioxydase“-Zone beschrieben hat. Die Analogie in der Lokalisation der oxydativen und reduktiven Partien des Kapillarisationfeldes lässt daran denken, dass das System Ascorbinsäure-Dehydro-ascorbinsäure auch bei jenen Versuchen Träger der oxydativen, wie der reduktiven „Fermentwirkungen“ ist.

In einfacher Weise liessen sich z. B. am Kapillarisationfeld eines Methylenblau-Ascorbinsäuregemisches die verschiedenen oxydativen Fähigkeiten der einzelnen Zonen in der Weise anschaulich machen, dass ein Kreis von ca. sechs voneinander isolierten Benzidin-Wasserstoffperoxyd-Tropfen in einigem Abstand rings um den kapillarisierten Methylenblau-Ascorbinsäure-Tropfen angelegt wurde. An das zentrale, vom zurückbleibenden Methylenblau eingenommene Feld schlossen sich die Ascorbinsäure- und Dehydro-ascorbinsäure-zonen an, und wo die letztere Zone mit den Benzidintropfen in Berührung kam, färbten sich diese auf der inneren, oxydativ auch beim Purpurogallinversuch stärker wirksamen Seite, tief gelb, durch das gebildete Holochinoid:



während die äussere Seite in der gewöhnlichen Weise reagierte, d. h. die blaue Farbe der Merichinoide ergab z. B. in der Formulierung von *Willstätter* und seiner Schule:

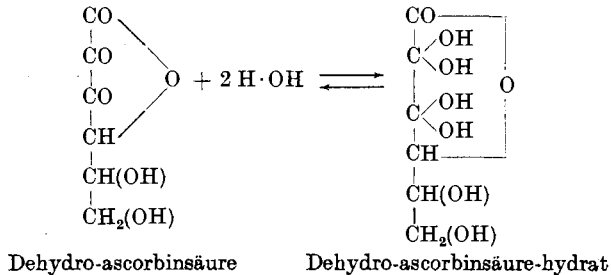


Ohne zu Hilfenahme der Kapillarisation ist es, auch an gut autoxydierten Ascorbinsäurelösungen, weit schwieriger, Peroxydase-wirkungen zu erhalten. So veranlasste zwar jeder in eine, mit wenigen Tropfen Trikresol und Wasserstoffperoxyd versetzte, sehr verdünnte p-Phenylendiaminlösung einfallende Tropfen autoxydierter — also grossenteils in Dehydro-ascorbinsäure übergeführter — Ascorbinsäurelösung im Moment des Einfallens Indophenolbildung. Die violette Färbung verschwand aber fast momentan und kann leicht überhaupt übersehen werden. Häufig erhielten wir auch gänzlich negative Resultate. Wir werden in folgenden Publikationen über die Bedingungen, unter denen Peroxydasewirkungen der Dehydro-ascorbinsäure zu beobachten sind und welche, im einzelnen berichten.

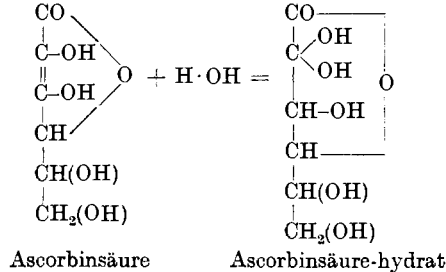
Die vorhin erwähnte Analogie im Verhalten der Kapillarisationen des Ascorbinsäure-Dehydro-ascorbinsäure-Systems und des Versuchsmaterials von *Grüss* bezog sich u. a. auf den Gerstenkeimling.

¹⁾ *Grüss*, Biologie und Kapillaranalyse der Enzyme. Berlin (1912) Verlag Bornträger.

Hier war *Grüss* die Feststellung der Identität des Trägers der „sekret-diastatischen“ und der peroxydatischen Wirkungen durch das Zusammenfallen der auf Stärke wirksamen und der peroxydierenden Zonen des Kapillarisationfeldes geglückt. U. a. aus diesem Grund schien uns die Frage prüfenswert, ob auch das Ascorbinsäure-Dehydro-ascorbinsäuresystem zu diastatischen Wirkungen befähigt sei. Die theoretischen Voraussetzungen wären, wie bei den Peroxydase-wirkungen, im Vorhandensein der beiden Ketogruppen gegeben, die, durch Addition von Wasser, in die unbeständige, Wasser auf geeignete Substrate übertragende Hydratform, übergehen könnten:



Auch die Ascorbinsäure selbst ist möglicherweise an ihrer Doppelbindung zur Aufnahme von Wasser befähigt und damit evtl. zur Ausübung hydratisierender Wirkungen:



Zur Prüfung auf diastatische Fähigkeiten des Ascorbinsäure-Dehydro-ascorbinsäure-Systems dienten die gewöhnlichen Kriterien: Die auf die Änderung des Dispersitätsgrades abstellende Änderung der Farbenreaktion bei Zusatz von Jod und die Verzuckerung der Stärke.

Von einer, durch Durchleiten von Luft während mehrerer Stunden autoxydierten, konzentrierten Ascorbinsäurelösung wurde, in üblicher Weise, eine Verdünnungsreihe 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$, $\frac{1}{128}$, $\frac{1}{256}$, $\frac{1}{512}$ hergestellt und jede Verdünnung mit der gleichen Menge einer 1-proz. Lösung von löslicher Stärke versetzt. Als Kontrolle diente die mit der gleichen Menge Wasser statt Ascorbinsäure, vermischte Stärkelösung. Während die Kontrolle schon mit einem Tropfen 0,0005-n. Jodlösung sofort mit reiner Blaufärbung reagierte,

zeigte die grösste, in den Vorversuchen verwendete Verdünnung der Ausgangslösung + Stärke, nach dem Stehen über Mittag, nur eine leicht gelbliche Färbung, die allmählich, mit steigendem Jodzusatz aus einer Mikrobürette, in die violette Amylodextrinfärbung und erst nach weiterem relativ sehr beträchtlichem Jodzusatz in die blaue Jodstärkefärbung übergang. Es handelt sich also um die typische Farbenänderung, wie sie diastatische Stärkespaltgemische mit Jod zeigen, nicht bloss um eine Jodbindung, wie sie für ascorbinsäurehaltige Lösungen selbstverständlich wäre. Die Frage ist nur, wie weit ist die Dispersitätsreaktion mit Jod für eine echte Spaltung beweisend?¹⁾ Aber diese Frage gilt für die Wirkung der „Diastasen“ genau so gut, wie für das Ascorbinsäure-Dehydro-ascorbinsäure-system oder wie für das Formaldehydmodell der Diastasewirkung, über welches vor Jahren *H. Maggi* auf Veranlassung der einen von uns gearbeitet hat²⁾.

Die mit dem Ascorbinsäure-Dehydro-ascorbinsäure-System versetzte Stärkelösung zeigt auch schon ohne Jodzusatz eine typische, mit der Änderung des Dispersitätsgrades einhergehende Änderung: Die durch feinste, suspendierte Stärkepartikel getrübe Stärkelösung erscheint nach einigem Stehen, in Berührung mit der autoxydierten Ascorbinsäurelösung, völlig klar.

Bei der Prüfung auf Verzuckerung der Stärke war von vornherein mit der intensiven Eigenreduktionswirkung der Ascorbinsäure zu rechnen. Dieselbe war, unter unseren Versuchsbedingungen (tropfenweiser Zusatz zu 5 cm³ einer 10-fachen Verdünnung gleicher Mengen *Fehling'scher* Lösung I und II) eben nachweisbar bis zur Verdünnung $\frac{1}{32}$ unserer Stammlösung. Die mit der 1-proz. Stärkelösung versetzte Ascorbinsäureverdünnungsreihe ergab, nach dem Stehen über Mittag, eine wesentlich stärkere Reaktion als die Kontrolle noch bei der Verdünnung: $\frac{1}{42,5}$. Der Unterschied ist nicht gerade gross, — was in Anbetracht der geringen Versuchsdauer auch kaum zu erwarten war, — aber doch deutlich vorhanden. Eine Säurespaltung der Stärke durch Ascorbinsäure in dieser Verdünnung und bei Zimmertemperatur ist schwerlich anzunehmen. So hoffen wir bald über eingehende quantitative Versuche berichten zu können, die die diastatischen Wirkungen des Ascorbinsäure-Dehydro-ascorbinsäure-Systems sicherstellen. Da wir bei unseren orientierenden Versuchen über die fermentativen Qualitäten dieses Redoxsystems auch

¹⁾ Was die Jodreaktion für die Stärkespaltung bedeutet, bedeutet die Biuretreaktion für den Eiweissabbau, wobei eine schwache Kupferlösung bekanntlich als Kriterium für die Änderung des Dispersitätsgrades dient. Dementsprechend erhielten wir, nach Zusatz von 2 cm³ 2-n. Natronlauge zu 2 cm³ eines hälftigen Gemisches autoxydierter Ascorbinsäure und 1-proz. Albuminlösung nach 2 Tagen mit 1–2 Tropfen *Pavy'scher* Kupfersalzlösung (*Pavy I*) Peptonfärbung bis zur 3. Verdünnung ($\frac{1}{4}$), Versuchsbedingungen, unter denen die Säurekonzentration eine Störungsquelle sein kann.

²⁾ *H. Maggi*, Fermentforschung 1919; *G. Woker*, B. 49, 2311 (1916).

andere als die hier beschriebenen Wirkungen — hydrolysierende, katalatische, desaminierende und decarboxylierende — in den Kreis unserer Betrachtungen gezogen haben, so bitten wir um freundliche Reservierung dieses Arbeitsgebietes.

Laboratorium für physikalisch-chem. Biologie der
Universität Bern.

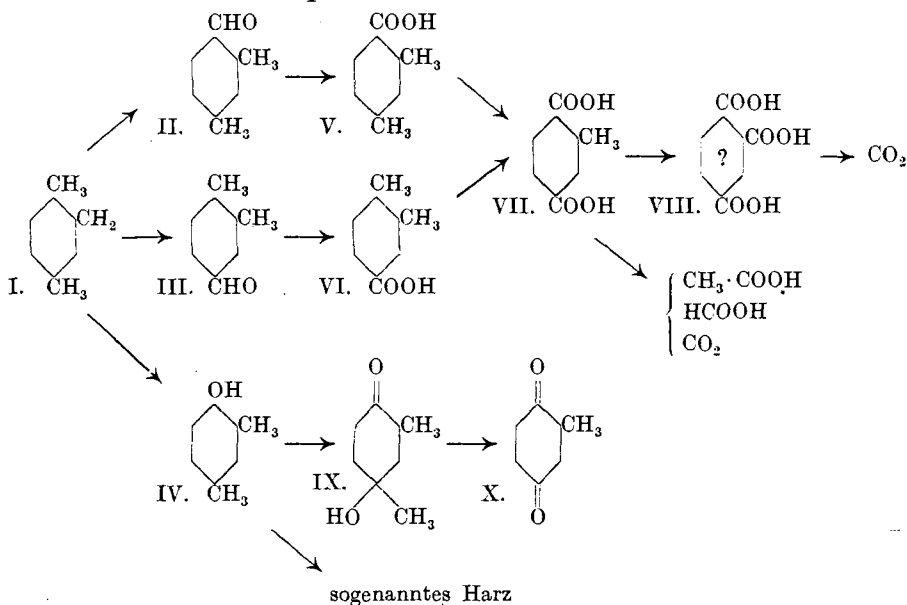
18. Die elektrochemische Oxydation der Benzolhomologen VII. Pseudocumol (1,2,4-Trimethyl-benzol)¹⁾

von Fr. Fichter und Guido Schetty²⁾.

(29. XI. 36.)

1. Einleitung.

Aus Pseudocumol (1,2,4-Trimethyl-benzol) I erhielten *H. D. Law* und *F. M. Perkin*³⁾ durch elektrochemische Oxydation ein Gemisch von Dimethyl-benzaldehyden, das sie nicht zu trennen und zu identifizieren vermochten. Eine genaue Untersuchung hat nun gezeigt, dass hier, wie in den bisher von uns geprüften Fällen, eine grosse Mannigfaltigkeit der verschiedensten Stoffe durch Seitenkettenoxydation und durch Kernhydroxylierung entsteht, die wir übersichtlich an die Spitze stellen:



¹⁾ VI. Mitteilung, *Helv.* **18**, 831 (1935).

²⁾ Auszug aus der Diss. *Guido Schetty*, Basel 1937.

³⁾ Faraday Lecture, *Faraday* **1**, 31 (1904); vgl. *Soc.* **91**, 236 (1907).