

Untersuchungen über die Biosynthese der Vitamine der Folsäuregruppe bei grünen Pflanzen

Die vorliegenden Untersuchungen gelten dem Einfluss des Lichtes und der Ascorbinsäure auf den Gehalt der mit *Streptococcus faecalis* R ATCC 8043 und *Leuconostoc citrovorum* ATCC 8081 erfassbaren Verbindungen der Folsäuregruppe in Wurzel und Spross von *Pisum sativum*.

Mit *Streptococcus faecalis* R ATCC 8043 bestimmen wir die Folsäure (Pteroylglutaminsäure) und weitere aktive Faktoren, welche sich von ihr ableiten lassen, während wir mit *Leuconostoc citrovorum* ATCC 8081 den Citrovorumfaktor (N⁵-formyltetrahydropteroylglutaminsäure, Leucovorin) und einige seiner Derivate erfassen (siehe NICHOL *et al.*¹).

Grüne Pflanzenteile, besonders Blätter und Knospen, weisen einen erhöhten Gehalt an Vitaminen der Folsäuregruppe auf^{2,3}. Eine ähnliche Verteilung zeigt die Ascorbinsäure, welche außerdem in belichteten Pflanzen reichlicher synthetisiert wird als in unbelichteten⁴. Da wir wiederholt beobachteten, dass auch der Folsäuregehalt in belichteten Pflanzen höher ist, war es von Interesse, in parallelen Messungen den Gehalt an Ascorbinsäure mit dem Gehalt an Folsäure und Citrovorumfaktor zu vergleichen und die Wirkung von Licht und Dunkel und von exogener Ascorbinsäure zu untersuchen.

Die Versuche wurden mit 6 Tage alten Keimlingen von *Pisum sativum* (Handelssorte «Maikönigin») ausgeführt, welche steril in Kulturröhren mit Knop'scher Nährösung bei konstanter Temperatur im Dunkeln wuchsen. Den einen Teil dieser nach gleicher Grösse und fehlerfreiem Wuchs sorgfältig ausgewählten Pflänzchen beleuchteten wir während 4 Tagen mit 2 Fluoreszenzröhren aus etwa 30 cm Entfernung. Einem weiteren Teil der im Dunkeln verbliebenen Pflanzen führten wir am Anfang des 3. Versuchstages steril 200 μ Ascorbinsäure pro ml Nährösung zu. Am Ende des 2. und 4. Tages wurden die Pflanzen geerntet und die Wurzeln vom Spross getrennt.

Je zwei Serien zu 4 Sprossen bzw. Wurzeln wurden unverzüglich zur Vitamin-C-Bestimmung weiterverarbeitet. Diese erfolgte kolorimetrisch mittels Phosphor-18-Wolframsäure nach FUJITA und EBIHARA⁵. Dabei berücksichtigten wir nur die reduzierte Form (hier als AS bezeichnet).

¹ C. A. NICHOL, A. H. ANTON und S. F. ZAKREWSKI, *Science* 121, 275 (1955).

² E. E. C. FAGER, O. E. OLSON, R. H. BURRIS und C. A. ET-VEHJEM, *Food Res.* 14, 1 (1949).

³ W. H. SCHOPFER und E. G. GROB, *Bull. Soc. Chim. biol.* 36, 1195 (1954).

⁴ W. FRANCKE, *Planta* 44, 437 (1954); 45, 166 (1955).

⁵ A. FUJITA und T. EBIHARA, *Biochem. Z.* 290, 182 (1937).

Tabelle I

Trockengewicht und Totalgehalt an AS, FA und CF von Wurzel und Spross 6tägiger *Pisum*keimlinge bei Versuchsbeginn. TG = Trockengewicht, AS = Ascorbinsäure, FA = aktive Substanzen für *Streptococcus faecalis* 8043, CF = aktive Substanzen für *Leuconostoc citrovorum* 8081

	TG	AS	FA	CF
Wurzel . . .	15,3 mg	16,8 γ	60,8 my	26,1 my
Spross . . .	27,2 mg	65,7 γ	62,7 my	33,5 my

Je drei weitere Serien trockneten wir 24 h lang bei $70 \pm 5^\circ\text{C}$. Das fein gemahlene Material wurde mit destilliertem Wasser im Autoklav während 15 min bei 115°C extrahiert. Aus dem filtrierten Extrakt wurden die für *Streptococcus faecalis* und *Leuconostoc citrovorum* aktiven Substanzen (hier mit FA und CF angegeben) nach der klassischen Methode gemessen unter Verwendung von Disc-Assay-Medien und von Pteroylglutaminsäure «Roche» und Leucovorin «Lederle» als Standardsubstanzen.

Zur Beurteilung der gemessenen Werte wurden die unter den gegebenen Versuchsbedingungen erfolgten Zunahmen von Trockengewicht und Totalgehalt an AS, FA und CF in Prozenten ausgerechnet (Werte bei Versuchsbeginn = 100%). Die Ergebnisse stehen in Tabelle I und II. Angegeben sind die Mittelwerte aus 2 bzw. 3 Parallelserien.

Mit einer stärkeren Zunahme des AS-Gehaltes als Folge der Belichtung oder der Aufnahme von exogener Ascorbinsäure tritt deutlich eine stärkere Zunahme der für *Streptococcus faecalis* und *Leuconostoc citrovorum* aktiven Substanzen in Erscheinung. Dasselbe beobachteten wir auch an *Pisum*keimlingen, welche wir während 1 h in gepufferte (pH 6) und verschieden stark konzentrierte Ascorbinsäurelösungen eingetaucht hatten. Da die Ascorbinsäure in verschiedenen Konzentrationen die FA- und CF-Werte deutlich beeinflusst, darf angenommen werden, dass am unterschiedlichen Gehalt dieser Substanzen in Licht- und Dunkelpflanzen des beschriebenen Versuches zumindest die Ascorbinsäure mitverantwortlich ist. Es herrscht jedoch keine strenge Parallelität; die vielfach höhere AS-Konzentration in der Wurzel nach Behandlung mit Ascorbinsäurelösung hat keinen entsprechend hohen Anstieg von FA und CF zur Folge. Weitere limitierende Faktoren müssen deshalb angenommen werden, entweder in Form inaktiver Substanzen, welche *in vivo* oder während des Trocknungs- oder Extraktionsprozesses unter dem Einfluss von AS eine molekulare Umwandlung in aktive Substanzen erfahren, oder aber in Form labiler Folsäurederivate, die durch Anwesenheit von AS vor Inaktivierung geschützt werden.

Tabelle II

Prozentuale Zunahme des Trockengewichts und Totalgehaltes an AS, FA und CF von *Pisum*keimlingen, welche a) im Dunkeln, b) im Licht, c) im Dunkeln mit 200 μ Ascorbinsäure pro ml Nährösung gezogen wurden (Werte bei Versuchsbeginn = 100%; siehe Tabelle I)

		a) unbelichtet				b) belichtet				c) unbelichtet + AS			
		TG	AS	FA	CF	TG	AS	FA	CF	TG	AS	FA	CF
2. Tag	Wurzel	21	-15	25	19	43	91	115	78				
	Spross	78	113	76	74	68	249	287	500				
4. Tag	Wurzel	55	13	34	0	59	51	152	93	42	1275	100	93
	Spross	154	166	138	190	122	251	454	747	158	170	203	300

Die zweite Annahme besitzt eine grössere Wahrscheinlichkeit, da nach DOCTOR⁶ bei männlichen Ratten nach Verabreichung von Ascorbinsäure *in vivo* keine Förderung der Umwandlung von Folsäure in Citrovorumfaktor stattfindet; hingegen schützt die im Urin mitausgeschiedene Ascorbinsäure eine labile Vorstufe des Citrovorumfaktors vor Zerstörung durch Luftzutritt und Hitze. Die Untersuchungen von IWAI und NAKAGAWA⁷ zeigen ferner, dass auch im pflanzlichen Gewebe labile Derivate der Pteroylglutaminsäure angenommen werden müssen.

K. ERISMANN und W. H. SCHOPFER

Botanisches Institut und botanischer Garten der Universität Bern, 31. Juli 1959.

Résumé

Des plantules de Pisum sont cultivées aseptiquement en milieu synthétique. A la lumière, elles synthétisent plus de facteurs du groupe de l'acide folique, déterminés par voie microbiologique, et plus d'acide ascorbique qu'à l'obscurité. L'adjonction d'acide ascorbique au milieu des plantes cultivées à l'obscurité compense partiellement l'absence de lumière.

⁶ V. M. DOCTOR, J. biol. Chem. 233, 982 (1958).

⁷ K. IWAI und S. NAKAGAWA, Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ. 15, 48 (1958).

Die Anwendung der wiederholten Entwicklung zur Trennung der Steroide auf dem Papier

Bei der wiederholten Chromatographie entwickeln wir das Chromatogramm zuerst mit einem Lösungsmittel, trocknen und wiederholen nochmals die Entwicklung mit demselben oder einem anderen Lösungsmittel in derselben Richtung; jeder Fleck des ersten Chromatogramms bildet den Start für die zweite Chromatographie. Diese Methode wurde zur Trennung von Gemischen benutzt, welche in den einzelnen Lösungsmittelsystemen durchzuführen unmöglich wäre. Mit dieser Methode wurden zum Beispiel Aminosäuren und Peptide^{1,2}, Zucker³ und Porphyrine⁴ getrennt. NEHER und WETTSTEIN⁵ trennten auf diese Weise schwach polare Steroide. In allen diesen Fällen wurde das Chromatogramm immer in derselben Distanz vom Start entwickelt. Beim Vergleich mit der zweidimensionalen Chromatographie bietet diese Methode Vorteile bei der Serienbestimmung oder bei der Trennung einer grösseren Zahl von Proben. Die Flecken der Substanzen werden sehr scharf.

Wir benützen zur Trennung der Steroide, vorzugsweise der Östrogene, die Entwicklung mit zwei verschiedenen Lösungsmitteln auf einem mit Formamid imprägnierten Papier. Die Distanz der Lösungsmittelfront vom Start wurde gewechselt und immer von vorneherein bestimmt. Aus den R_f -Werten der Steroide in den einzelnen abgeteilten Systemen wurde die Beziehung für die Distanz

der Substanz vom Start nach wiederholter Entwicklung bestimmt:

$$D = a \cdot R_{f1} \cdot (1 - R_{f2}) + b \cdot R_{f2}, \text{ wo}$$

$R_{f1} = R_f$ der Substanz im 1. Lösungsmittelsystem;

$R_{f2} = R_f$ der Substanz im 2. Lösungsmittelsystem;

a =Distanz der Lösungsmittelfront vom Start nach der 1. Entwicklung;

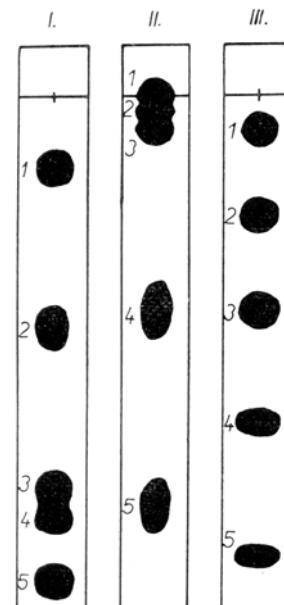
b =Distanz der Lösungsmittelfront vom Start nach der 2. Entwicklung.

Der Wirkungskreis, in welchem sich D bewegen kann, ist durch folgende Beziehung bedingt:

$$0 \leq D \leq a_{\max} \cdot (R_{f1} - R_{f1} \cdot R_{f2} + R_{f2});$$

a_{\max} =maximal mögliche Distanz der Lösungsmittelfront vom Start (abhängig von der Länge des Papiers).

In diesem Wirkungskreis besteht also die Möglichkeit, durch Festsetzung der Distanz Lösungsmittelfront/Start der Versuchsbedingungen entsprechend der abzutrennenden Substanz zu normieren. So ist es möglich, auf einem einzigen Papier ganz gut Substanzen von sehr verschiedener Polarität zu trennen.



Trennungsschema einiger Steroide in einzelnen Lösungsmittelsystemen und nach wiederholter Entwicklung

Lösungsmittelsysteme:

I. 30% Formamid/Chloroform	40 cm vom Start
II. 30% Formamid/Toluol	40 cm vom Start
III. 30% Formamid	20 cm vom Start
a) Chloroform	40 cm vom Start
b) Toluol	40 cm vom Start

1 = Östriol, 2 = Cortisol, 3 = Cortison, 4 = Östradiol-17-beta, 5 = Östron.

Chromatographisches Papier Whatman 1 mit der eingetragenen Probe ziehen wir durch eine 30% Methanolösung von Formamid, trocknen zwischen zwei Schichten von Filterpapier und lassen noch 10 min frei unbedeckt liegen. Dann entwickeln wir das Chromatogramm absteigend bis zu der bestimmten Distanz vom Start, lassen bei Zimmertemperatur abtrocknen (nach Entwicklung mit Chloroform genügen 30 min), und ohne weitere Imprägnation setzen wir die Entwicklung mit dem zweiten Lösungsmittel fort (Toluol).

Cortisol, Cortison, Östron, Östradiol-17-beta und Östriol wurden getrennt. Die R_f -Werte und die Distanzen der

¹ S. E. SEVERIN und V. N. FJODOROVA, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 82, 443 (1952).

² B. KEIL, Chem. Listy 48, 725 (1954).

³ A. JEANES, C. S. WISE und R. J. DIMLER, Analyt. Chem. 23, 415 (1951).

⁴ T. C. CHU, A. A. GREEN und E. J. CHU, J. biol. Chem. 190, 643 (1951).

⁵ R. NEHER und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 35, 276 (1952).