Abb. 4. Prozentuale Absorption des gelbgrünen Pigments von *Vaucheria synandra* (offene Kreise), zum Vergleich diejenige von reinem Chlorophyll a, umgerechnet auf gleichstarke Absorption im Rotmaximum (gefüllte Kreise).

sorption im Rot in den übrigen Spektralbereichen stärker, vor allem im Blau und im Blaugrün. Die ätherische Lösung dieses gelbgrünen Farbstoffes zeigte mit konzentrierter Schwefelsäure und mit Salzsäure keine Carotinoid-Reaktion (KARRER und JUCKER¹⁰).

¹⁰ P. KARRER u. E. JUCKER, Carotinoide, Verlag Birkhäuser, Basel 1948.

KER¹⁰). Der Phasentest (PAECH und TRACEY¹¹), Übersichtung von KOH-haltigem Methanol mit der ätherischen Farbstofflösung und anschließender Durchmischung der beiden Lösungen, ergab eine vollkommen farblose Ätherlösung über dem zunächst gelb, dann schwach grüngelb gefärbten Methylalkohol, also auch kein Anzeichen für Vermischung mit Carotinoiden. — Da die Absorptionsmaxima an denselben Stellen liegen, wie diejenigen von reinem Chlorophyll a, handelt es sich hier wohl auch nicht um Allomerisationsprodukte von Chlorophyll a. Es ist vermutlich Chlorophyll a, welches an andere Stoffe gebunden ist und wurde wohl oft wegen seiner dem Chlorophyll b ähnlichen Färbung für Chlorophyll b gehalten.

Fräulein B. MEISTER und I. WÜRZBERG danke ich für die Mithilfe bei den Versuchen.

¹¹ K. PAECH u. M. V. TRACEY, Moderne Methoden der Pflanzenphysiologie, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955.

Über das Vorkommen von Djenkolsäure und einer C-S-Lyase in den Samen von *Albizzia lophantha* Benth. (Mimosaceae)

Von ROLF GMELIN, GERHARD HASENMAIER und GÜNTHER STRAUSS

Aus dem wissenschaftlichen Laboratorium der Robugen G. m. b. H., Eßlingen am Neckar

(Z. Naturforschg. 12 b, 687—697 [1957]; eingegangen am 23. Juli 1957)

Es wird das Vorkommen eines neuen Enzyms, einer C-S-Lyase, und seines natürlichen Substrates, der Djenkolsäure, in den Samen von *Albizzia lophantha* Benth. (Mimosaceae) beschrieben.

Djenkolsäure wird durch das Enzym in Brenztraubensäure, Ammoniak und einen lauchartig riechenden Stoff, bei dem es sich wahrscheinlich primär um das sehr instabile Methylendithiol handelt, gespalten.

Das Albizzia-Enzym spaltet außerdem S-Alkyl-L-cysteine und Cystathionin, S-Alkyl-L-cysteinsulfoxyde und L-Cystein.

Bei der Spaltung der S-Alkyl-L-cysteine entstehen Brenztraubensäure, Ammoniak und Mercaptane, Cystathionin zerfällt in Brenztraubensäure, Ammoniak und Homocystein, die S-Alkyl-L-cysteinsulfoxyde werden in Brenztraubensäure, Ammoniak und Alkylthiosulfinsäurealkylester gespalten.

Die Spaltung von L-Cystein, bei der Ammoniak und H₂S gebildet werden, ist im einzelnen noch ungeklärt.

Es werden einige Alkyl-thiamindisulfide beschrieben, die durch Umsetzung der enzymatisch gebildeten Alkylthiosulfinsäurealkylester mit Thiamin bei pH 8 gewonnen wurden. Aus S-Benzyl-L-cysteinsulfoxyd ließ sich durch enzymatischen Abbau Benzylthiosulfinsäurebenzylester kristallin erhalten.

Durch enzymatische Spaltung von S-Methyl-DL-cystein wurde S-Methyl-D-cystein gewonnen.

Das Albizzia-Rohenzym hat ein pH-Optimum von 8,5, ein Temperaturoptimum bei 37° C. Es wird durch Pyridoxalphosphat aktiviert und durch Carbonylreagentien inaktiviert. Durch Glycin wird es sehr stark gehemmt.

Alle bisher im Pflanzenreich bekannten S-haltigen Aminosäuren leiten sich von L-Cystein und L-Methionin ab. Ihre Zahl ist — einschließlich der noch nicht restlos aufgeklärten Vertreter — heute auf etwa 15 angestiegen.

^{1a} A. G. VAN VEEN u. A. J. HYMAN, Geneeskund Tijdschr. Nederl. Indië 73, 991 [1933].

Zur Orientierung sei einleitend eine kurze Übersicht über diese Cystein- und Methioninderivate gebracht.

Aus der Djenkolbohne (*Pithecolobium lobatum* und *P. bigeminum* [Mimosaceae]) isolierten VAN VEEN und HYMAN¹ eine Aminosäure, die sie Djenkolsäure nannten. Die von den Autoren für Djenkolsäure vorgeschla-

^{1b} A. G. VAN VEEN u. A. J. HYMAN, Rec. Trav. bot. néerl. 54, 493 [1935].

gene Formulierung als L-Cysteinthioacetal des Formaldehyds konnten DU VIGNEAUD u. a. bestätigen² und durch Synthese beweisen³. Nach eigenen Untersuchungen⁴ kommt Djenkolsäure auch in *Pithecolobium multiflorum* und in *P. dulce* vor. Es ist anzunehmen, daß sie eine in Mimosaceen-Arten weitverbreitete Aminosäure ist.

Aus den Zwiebeln von *Allium sativum* und *Allium ursinum* (Liliaceae) gewannen STOLL und SEEBECK⁵ Alliin, (+)S-Allyl-L-cysteinsulfoxyd, und klärten die enzymatische Bildung des antibiotisch wirksamen Alliins aus dieser Vorstufe auf. MATSUKAWA u. a.⁶ schlossen aus dem Nachweis von Methylthiosulfinsäuremethyl-ester und Propylthiosulfinsäurepropylester, daß auch S-Methyl- und S-Propyl-L-cysteinsulfoxyd in diesen und einigen anderen Allium-Arten enthalten sein müssen. Einen indirekten Beweis für die Existenz einer ähnlich gebauten Aminosäure, die ebenfalls enzymatisch gespalten wird, in der Küchenzwiebel (*Allium cepa*, Liliaceae) fand VILKKI⁷ bei papierchromatographischen Studien. VIRTANEN⁸ gewann aus dem Säurehydrolysat der Küchenzwiebel eine S-haltige Aminosäure der Bruttoformel $C_6H_{11}O_2NS$, der er die vorläufige Formulierung $C_3H_5-S-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ gab.

2 weitere S-haltige Aminosäuren wurden in Brassica-Arten entdeckt:

S-Methyl-sulfonium-methionin (McRORIE u. a.⁹) und (+)S-Methyl-L-cysteinsulfoxyd (SYNGE und WOOD¹⁰ und unabhängig davon MORRIS und THOMPSON¹¹). Letzteres soll nach VIRTANEN¹² auch in anderen Cruciferen-Arten vorkommen. Aus den Samen der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*, Papilionaceae) isolierten THOMPSON und ZACHARIUS¹³ (–)S-Methyl-L-cystein.

Die gleiche Aminosäure wurde auch als natürlicher Anabolit in *Neurospora crassa* angetroffen (RAYLAND und LIVERMAN¹⁴), für die sie Wuchsstoffeigenschaften zu besitzen scheint.

CANTONI¹⁵ erkannte im „aktiven Methionin“, S-Adenosyl-L-methionin, die für einige Transmethylierungs-Reaktionen verantwortliche energiereiche Form des

L-Methionins. Vermutlich spielt diese Verbindung auch in der Pflanze, in der Methylierungs-Prozesse besonders häufig sein müssen – man denke an die vielen Naturstoffe mit CH_3-O- , CH_3-N- und CH_3-S- Gruppen –, eine ähnliche Rolle wie im tierischen Organismus.

Cystathionin nimmt eine Zwischenstellung zwischen Methionin, Homocystein und Cystein ein¹⁶. Es ist bei der Umbildung dieser Stoffe nach folgendem Reaktionsschema beteiligt:

1. Methionin $-CH_3 \rightarrow$ Homocystein,
2. Homocystein + Serin $\rightarrow$ Cystathionin,
3. Cystathionin $\rightarrow$ Cystein + Homoserin.

Der Vollständigkeit halber gehören in diese Aufzählung 2 weitere Di-aminosäuren mit einer Thioätherbrücke: das als solches noch nicht isolierte S- α (β -Indolylalanin)-L-cystein, ein Baustein des Knollenblätterpilz-Giftstoffes Phalloidin, und der noch hypothetische, ähnlich gebaute Baustein der Amanitine, mit deren Aufklärung sich zur Zeit WIELAND und Mitarbb.¹⁷ befassen.

Auf Grund der wichtigen biochemischen Funktionen der S-haltigen Aminosäuren sind natürlich auch die an ihrem Auf- und Abbau beteiligten Enzymreaktionen von größtem Interesse – vor allem solche, bei denen C–S-Bindungen gebildet oder gelöst werden.

Eine Cysteinase aus *Proteus vulgaris* wurde erstmals durch TARR¹⁸ beschrieben. Ähnliche Enzyme wurden später auch in anderen Mikroorganismen angetroffen: in *E. coli* (FROMAGEOT und DESNUELLE¹⁹), in *Bacillus subtilis* (FROMAGEOT und KIUN²⁰) und in *Propionibacterium pentosaceum* (DESNUELLE u. a.²¹). FROMAGEOT²² und SMYTHE²³ berichteten über Desulfhydrasen tierischen Ursprungs. BINKLEY²⁴ beschrieb eine Desulfhydrase mit einem pH -Optimum von 6,8–7,2, die Cystein

² V. DU VIGNEAUD u. W. J. PATTERSON, J. biol. Chemistry **114**, 535 [1936].

³ M. D. ARMSTRONG u. V. DU VIGNEAUD, J. biol. Chemistry **168**, 373 [1947].

⁴ R. GMELIN u. G. HASENMAIER, unveröffentlicht.

^{5a} A. STOLL u. E. SEEBECK, Helv. chim. Acta **31**, 189 [1948].

^{5b} A. STOLL u. E. SEEBECK, Helv. chim. Acta **32**, 197 [1949].

^{5c} A. STOLL u. E. SEEBECK, Scientia pharmac. **18**, 61 [1950].

^{5d} A. STOLL u. E. SEEBECK, Experientia [Basel] **6**, 330 [1950].

⁶ T. MATSUKAWA, S. YURUGI u. T. MATSUOKA, Science [Washington] **118**, 109 [1953].

⁷ P. VILKKI, Suomen Kemistilehti B **27**, 21 [1954].

⁸ A. I. VIRTANEN u. E. MATTIKKALA, Suomen Kemistilehti B **29**, 134 [1956].

⁹ R. A. McRORIE, G. L. SUTHERLAND, M. S. LEWIS, A. D. BARTON, M. R. GLAZENER u. W. SHIVE, J. Amer. chem. Soc. **76**, 115 [1954].

¹⁰ R. L. M. SYNGE u. J. C. WOOD, Biochem. J. **60**, 15 [1955].

¹¹ C. J. MORRIS u. J. F. THOMPSON, J. Amer. chem. Soc. **78**, 1605 [1956].

¹² A. I. VIRTANEN, Festschrift ARTHUR STOLL, 575, Birkhäuser, Basel 1957.

¹³ J. F. THOMPSON u. R. M. ZACHARIUS, Nature [London] **178**, 593 [1956].

¹⁴ J. B. RAYLAND u. J. L. LIVERMAN, Arch. Biochem. Biophysics **65**, 574 [1956].

¹⁵ G. L. CANTONI, J. Amer. chem. Soc. **74**, 2942 [1952]; J. biol. Chemistry **189**, 745 [1951].

¹⁶ E. S. WEST u. W. R. TODD, Textbook of Biochemistry, 1126, Macmillan Co., New York 1955.

¹⁷ Th. WIELAND, Angew. Chem. **69**, 44 [1957].

¹⁸ H. L. A. TARR, Biochem. J. **27**, 1869 [1933].

¹⁹ C. FROMAGEOT u. P. DESNUELLE, Enzymologia [Den Haag] **6**, 80 [1939].

²⁰ C. FROMAGEOT u. T. P. KIUN, Bull. Soc. Chim. Biol. **23**, 1471 [1941].

²¹ P. DESNUELLE, E. WOKEY u. C. FROMAGEOT, Enzymologia [Den Haag] **8**, 225 [1940].

²² C. FROMAGEOT, E. WOKEY u. P. CHAIX, Enzymologia [Den Haag] **9**, 198 [1940].

²³ C. V. SMYTHE, J. biol. Chemistry **142**, 387 [1942].

²⁴ F. BINKLEY, J. biol. Chemistry **150**, 261 [1943].

spaltet, außerdem ein Enzym aus Rattenleber, das Cystein und gleichzeitig einige Thioäther-Derivate spaltet²⁵. An einer Enzymzubereitung aus *Proteus morgani*, die aus Cystein äquimolare Mengen von Brenztraubensäure, Ammoniak und H₂S bildet, stellte KALLIO²⁶ eine Aktivierung durch Pyridoxalphosphat fest. Eine entsprechende Aktivierung erfährt ein methionin-spaltendes Enzym aus *Clostridium sporogenes* (WIESENDANGER und NISMAN²⁷).

Einen neuen Typ enzymatischer C-S-Spaltung beschrieb vor kurzem CANTONI²⁸: ein Enzym der Alge *Polysiphonia lanosa* bildet aus dem in der gleichen Art vorkommenden Propiothetin Dimethylsulfid und Acrylsäure.

In höheren Pflanzen war die von STOLL und SEEBECK²⁹ aufgefundene und eingehend untersuchte Alliinase das einzige in diese Gruppe gehörende Enzym. Ihre Spezifität beschränkt sich jedoch auf Aminosäuren vom Typ (+)S-Alkyl-L-cysteinsulfoxyd. Wie GORJATSCHENKOWA³⁰ feststellte, ist Pyridoxalphosphat das Coferment der Alliinase.

Vor kurzem gelang MATSUO³¹ die Isolierung eines kristallinen Enzyms aus Rattenleber, das Cystathionin in Cystein, Ammoniak und α -Ketobuttersäure zerlegt.

Es seien in diesem Zusammenhang noch die erst kürzlich beschriebenen enzymatischen Synthesen von S-Methyl-L-cystein aus L-Serin und Methanthiol (WOLF und BLACK³²) und von L-Cystein aus L-Serin und H₂S (SCHLOSSMANN und LYNEN³³) erwähnt.

In dieser Arbeit beschreiben wir die Auffindung eines neuen Enzyms aus dieser Gruppe sowie die Isolierung seines natürlichen Substrats Djenkolsäure aus den Samen von *Albizzia lophantha* Benth. (Mimosaceae).

Über Inhaltstoffe und Enzyme in *Albizzia*-Arten sind in der Literatur nur vereinzelte Angaben zu finden. Nach VIRTANEN³⁴ ist in den Samen von *Albizzia lophantha* Benth. 4-Hydroxypipicolinsäure enthalten.

Für *Albizzia lebbek* Benth. sind Monobutyrase und Urease als Enzyme angegeben (TANAKA³⁵). Als

einen Hinweis auf S-haltige Verbindungen in diesen und verwandten Arten kann man den knoblauchartigen Geruch auffassen, der in vielen Mimosaceen-Arten auftritt³⁶: *Pithecolobium bigeminum*, *Albizzia luzida*, *Acacia jarnesiana*, *Parkia speciosa* und andere. Über die chemische Natur der verantwortlichen Verbindungen und über die mögliche Beteiligung von Enzymen bei der Geruchsbildung scheinen jedoch bisher keine Angaben vorzuliegen.

Beim Behandeln des Samenpulvers von *Albizzia lophantha* mit kaltem Wasser trat ein starker und unangenehmer Geruch auf, der deutlich an den Geruch zerriebener Küchen- oder Knoblauchzwiebeln erinnerte. Mit Methanol, Äthanol oder verdünnter Salzsäure blieb die Bildung des Geruchsstoffes aus. Nahm man jedoch den Rückstand eingedampfter methanolischer Auszüge aus den Samen in Wasser auf und versetzte die Lösung mit einer Proteinfällung, die man durch Zugabe von überschüssigem Alkohol zu einem wäßrigen Auszug der Samen erhalten konnte, so trat nach kurzer Zeit wieder der charakteristische Geruch auf.

Eine papierchromatographische Aminosäuren-Analyse des methanolischen Auszugs der Samen ließ eine Anzahl von Aminosäuren erkennen — darunter eine Aminosäure, die auf dem Papierstreifen nach einigen Stdn. Jodazidlösung entfärbte. Sie zeigte in diesem Verhalten Ähnlichkeit mit Methionin und S-Methylcystein, wies jedoch einen wesentlich geringeren R_f-Wert auf. Mit den wäßrigen Auszügen der *Albizzia*-Samen ließ sich papierchromatographisch gut verfolgen, wie diese Aminosäure im Verlauf von einigen Stdn. restlos verschwand.

Folgende Beobachtungen ergaben weitere Anhaltspunkte für einen enzymatischen Prozeß:

1. Jodazidlösung, die vom methanolischen Auszug der *Albizzia*-Samen nur sehr träge entfärbt wird, wurde vom wäßrigen Auszug spontan entfärbt. Die Geschwindigkeit der Entfärbung nahm mit der Zeit zu.

2. Der wäßrige Auszug gab mit zunehmender Zeit eine immer intensiver werdende Rotfärbung mit

²⁵ F. BINKLEY, J. biol. Chemistry **186**, 287 [1950].

²⁶ R. E. KALLIO, J. biol. Chemistry **192**, 371 [1951].

²⁷ S. WIESENDANGER u. B. NISMAN, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. **237**, 764 [1953].

²⁸ G. L. CANTONI u. D. G. ANDERSON, J. biol. Chemistry **222**, 171 [1956].

²⁹ A. STOLL u. E. SEEBECK, Advances in Enzymol. **11**, 377 [1951].

³⁰ E. V. GORJATSCHENKOWA, Doklady Akadem. Nauk SSSR **87**, 457 [1952].

³¹ Y. MATSUO, Feder. Proc. **16**, 218 [1957].

³² E. C. WOLF u. S. BLACK, J. Amer. chem. Soc. **78**, 5868 [1956].

³³ K. SCHLOSSMANN u. F. LYNEN, Angew. Chem. **69**, 179 [1957].

³⁴ A. I. VIRTANEN, loc. cit.¹².

³⁵ S. TANAKA, J. agric. chem. Soc. Japan, Bull. **6**, 454 [1930], zit. nach C. A. 1930, 4075.

³⁶ F. CZAPEK, Biochemie der Pflanzen, 2. Aufl., Bd. 3, G. Fischer, Jena 1921; O. WARBURG, Die Pflanzenwelt, Bd. 2, Bibliographisches Institut, Leipzig 1923.

alkalischer Nitroprussid-Natrium-Lösung. Der methanolische Auszug gab keine Farbreaktion mit diesem Reagenz.

3. Im wäßrigen Auszug ließen sich nach einiger Zeit Brenztraubensäure und Ammoniak nachweisen. Im methanolischen Auszug treten diese Stoffe erst nach Zugabe der gelösten Proteinfällung zum Trokenrückstand auf.

Die Darstellung der fraglichen Aminosäure erfolgte zunächst durch Ionenaustauscher. Hierbei konnte eine geringe Menge eines Stoffes gewonnen werden, der in allen Eigenschaften mit Djenkolsäure übereinstimmte und durch die Proteinlösung in Brenztraubensäure, Ammoniak und einen zwiebelartig riechenden Stoff zerlegt wurde.

Um eine größere Menge dieser Aminosäure zu gewinnen, wurden die Samen von *Albizzia lophantha* nach der Methode von VAN VEEN und HYMAN³⁷ aufgearbeitet. Wir erhielten dabei 1,6 g Djenkolsäure. Da sich Djenkolsäure nur sehr schwer und nur unter Zersetzung umkristallisieren ließ, was auch VAN VEEN und HYMAN beobachtet hatten, erhielten wir keine genauen Analysenwerte bei der Verbrennung. Unter Berücksichtigung eines unverbrennbaren Rückstands errechneten wir die Werte: C 32,43%, H 8,76%, N 11,61%, S 23,04% (ber. für $C_7H_{14}N_2S_2O_4$ C 33,06%, H 5,54%, N 11,01%, S 25,21%). Die Identität mit Djenkolsäure ergab sich zusätzlich durch papierchromatographischen Vergleich in verschiedenen Lösungsmitteln: der aus *Albizzia lophantha* isolierte Stoff zeigte in allen Lösungsmitteln gleiche R_f -Werte wie synthetische Djenkolsäure. Auch in ihrem Verhalten gegen das Albizzia-Enzym stimmten die beiden Stoffe völlig überein.

Aus der Bestimmung von enzymatisch gebildetem Ammoniak ließ sich für das von den Samenschalen befreite Samenpulver von *Albizzia lophantha* ein Djenkolsäuregehalt von etwa 2,1% ermitteln, für die ganzen Samen etwa 1,1 Prozent.

Es war uns bisher noch nicht möglich, den bei der enzymatischen Spaltung von Djenkolsäure neben Brenztraubensäure und Ammoniak gebildeten Thiolkörper, der für den unangenehmen Geruch verantwortlich ist, zu erfassen.

Er scheint sehr labil zu sein, denn er läßt sich durch Wasserdampf nicht unzersetzt übertreiben und zerfällt schon bei Raumtemperatur nach einiger Zeit unter H_2S -Abspaltung.

In Analogie zu ähnlichen enzymatischen Spaltungen von Cysteinderivaten unter Ammoniak-, Brenztraubensäure- und Thiolbildung nimmt die Djenkolsäure-Spaltung vermutlich folgenden Verlauf:

Das nach dieser Formulierung gebildete Methylendithiol zerfällt in H_2S und einen wiederum unbeständigen Körper (Thioformaldehyd [?]):

Abb. 1 zeigt schematisch die papierchromatographische Aminosäuren-Analyse der *Albizzia lophantha*-Samen, das Verschwinden von Djenkolsäure durch einen enzymatischen Prozeß und die gleichzeitige Neubildung von Brenztraubensäure.

Nachdem auf diese Weise gezeigt werden konnte, daß in den Samen von *Albizzia lophantha* Djenkol-

Abb. 1. Papierchromatographischer Nachweis der enzymatischen Spaltung von Djenkolsäure. A: Wässriger Auszug aus *Albizzia lophantha*-Samen. B: Methanolischer Auszug aus *Albizzia lophantha*-Samen. C: Synthetische Djenkolsäure + *Albizzia*-Enzym.

³⁷ A. G. VAN VEEN u. A. J. HYMAN, loc. cit.¹.

säure und gleichzeitig ein djenkolsäurespaltendes Enzym vorkommt, erhob sich die Frage der Spezifität dieses Enzyms. Mit einer Rohenzymzubereitung (s. experimenteller Teil) wurde zunächst eine Anzahl S-substituierter Cysteinderivate durchgeprüft: S-Methyl-, S-Äthyl-, S-Propyl-, S-Allyl- und S-Benzyl-L-cystein.

Bei allen genannten Cysteinderivaten trat eine Spaltung ein. In der Reaktionsmischung ließen sich Brenztraubensäure, Ammoniak und die jeweiligen, charakteristisch riechenden Mercaptane nachweisen.

Bei S-Methyl-DL-cystein konnte im Gegensatz zu S-Methyl-L-cystein, bei dem die Spaltung, gemessen an der Ammoniak- und Brenztraubensäure-Bildung etwa 90% betrug, nur eine 45-proz. Spaltung festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, daß nur die L-Formen der obengenannten Cysteinderivate gespalten werden. Eine Bestätigung dafür war die bequeme Isolierung von S-Methyl-D-cystein aus der Reaktionsmischung. Für die enzymatische Spaltung von S-Alkyl-L-cystein-Derivaten gilt vermutlich das Reaktionsschema:

Erwartungsgemäß wurde Cystathionin in gleicher Weise in Brenztraubensäure, Ammoniak und Homocystein gespalten

Da es sich um eine Mischung von DL- und allo-Cystathionin gehandelt hatte, trat nur eine partielle Spaltung ein (Resistenz der D-Form gegen das Enzym).

In Abb. 2 wird papierchromatographisch die Spaltung von Cystathionin und die enzymatische Bildung von Homocystein und Brenztraubensäure demonstriert.

Wir haben also in dieser Spaltung ein Gegenstück zur „normalen“ Cystathionin-Spaltung durch ein Enzym der Leber unter Bildung von Cystein, Ammoniak und α -Ketobuttersäure.

Lanthionin scheint ebenfalls durch das Albizzia-Enzym gespalten zu werden, denn es ließ sich Ammoniak nachweisen (25% der Theorie) und im PC

trat ein neuer Fleck auf, der mit Ninhydrin positiv reagierte [R_f -Wert in Butanol-Essigsäure-Wasser 4 : 1 : 1 0,25 (aufsteigend)]. Brenztraubensäure war jedoch nicht nachzuweisen. Der Verlauf dieser Spaltung ist noch ungeklärt.

Abb. 2. DL- und allo-Cystathionin + Albizzia-Enzym.

Abb. 3 zeigt den zeitlichen Verlauf der Spaltung von S-Alkyl-L-cysteinen durch das Albizzia-Enzym bei p_H 8,5. Die prozentuale Spaltung wurde durch gravimetrische Brenztraubensäure-Bestimmung und durch Titration des gebildeten Ammoniaks ermittelt.

Abb. 3. Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Spaltung von S-Alkyl-L-cysteinen. $n/20$ -Lösungen in Boratpuffer p_H 8,5; 0,5% Rohenzym; Raumtemperatur.

S-Benzyl-L-cystein und Djenkolsäure wurden wegen ihrer geringen Löslichkeit in Wasser nur qualitativ untersucht.

Ein weiteres Substrat für das Albizzia-Enzym ist L-Cystein. Auch hier ist der Verlauf der Spaltung noch nicht geklärt. Als Spaltprodukte ließen sich

Ammoniak und Schwefelwasserstoff, aber keine Brenztraubensäure nachweisen. Die Cysteinspaltung soll Gegenstand späterer Untersuchungen sein.

Die Vielseitigkeit des Albizzia-Enzyms zeigte sich bei der Prüfung von *S*-Methyl-, *S*-Äthyl-, *S*-Propyl-, *S*-Allyl- und *S*-Benzyl-L-cysteinsulfoxyd, denn auch diese Verbindungen wurden gespalten. Hier verläuft die Reaktion nach dem gleichen Schema, das STOLL und SEEBECK für die Alliinspaltung angegeben hatten:

Auch *S*-Benzyl-L-cysteinsulfoxyd, gegen das Alliinase indifferent ist, wird gespalten: Als Spaltprodukt ließ sich Benzylthiosulfinsäurebenzylester isolieren (Schmp. 81–83° C nach Umkristallisieren aus Äther-Petroläther).

Da sich die übrigen Alkylthiosulfinsäurealkylester, die alle einen sehr scharfen Geschmack besitzen, wegen ihrer leichten Zersetzlichkeit schlecht durch Vakuumdestillation reinigen ließen, wurde auf ihre Isolierung verzichtet. Zur Charakterisierung wurden sie unmittelbar mit Thiamin bei p_{H} 8 umgesetzt und in Alkylthiamindisulfide der Formel

übergeführt (MATSUKAWA u. a.³⁸), die sich nun bequem kristallin erhalten ließen. Einige Daten dieser Thiaminderivate sind in Tab. 1 zu finden.

Abb. 4 zeigt den zeitlichen Verlauf der enzymatischen Spaltung der Alkyl-L-cysteinsulfoxyde bei p_{H} 8,5.

Wie aus dem Verlauf der Kurven zu sehen ist, erfolgt bei (+)-*S*-Allyl-L-cysteinsulfoxyd (Alliin) eine rasche und nahezu vollständige Spaltung, wäh-

rend bei den synthetischen Sulfoxyd-Derivaten, die am *S*-Atom racemisch sind, die Spaltung bis 50% rasch erfolgt, von hier an jedoch sehr langsam weiterschreitet. Ähnliches hatten STOLL und SEEBECK auch bei der Alliinase beobachtet. Beide Enzyme scheinen demnach die dem natürlichen Alliin oder (+)-*S*-Methyl-L-cysteinsulfoxyd aus Brassica-Arten („Brassicin“) entsprechende Sulfoxyd-Form zu bevorzugen.

Abb. 4. Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Spaltung von *S*-Alkyl-L-cysteinsulfoxyden. *n*/20-Lösungen in Boratpuffer p_{H} 8,5; 0,5% Rohenzym; Raumtemperatur.

Abb. 5. Abhängigkeit der Aktivität des Albizzia-Enzyms vom p_{H} -Wert. Einzelansätze mit je 200 mg *S*-Methyl-L-cystein und 200 mg Rohenzym in 20 ml Boratpuffer p_{H} 8,5; Raumtemperatur. Versuchsdauer 4 Stunden.

Lanthioninsulfoxyd wurde – vielleicht auf Grund seiner geringen Löslichkeit in Wasser – nicht angegriffen.

Mit der hier aufgeführten, begrenzten Anzahl von Derivaten des L-Cysteins ist sicher die Zahl der spaltbaren Verbindungen nicht erschöpft. Es ist anzunehmen, daß auch die *S*-Alkyl-L-cysteine und *S*-Alkyl-L-cysteinsulfoxyde mit höheren Homologen der Paraffinreihe gespalten werden.

Interessant wäre noch eine Prüfung von Cystein-derivaten, bei denen am *S*-Atom aromatische oder heterocyclische Substituenten sowie Alkenreste sitzen.

³⁸ T. MATSUKAWA, H. KAWASAKI, T. IWATSU u. S. YURUGI, J. Vitaminology 1, 13 [1954].

Ausgangsamminosäure	Enzymatisches Spaltprodukt	Reaktionsprodukt mit Thiamin; R=	Schmp. (Zers.) [°C]
<i>S</i> -Methyl-L-cysteinsulfoxyd	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_3$ $\downarrow$ O	CH_3-	136
<i>S</i> -Äthyl-L-cysteinsulfoxyd	$\text{C}_2\text{H}_5-\text{S}-\text{S}-\text{C}_2\text{H}_5$ $\downarrow$ O	C_2H_5-	126
<i>S</i> -Propyl-L-cysteinsulfoxyd	$\text{C}_3\text{H}_7-\text{S}-\text{S}-\text{C}_3\text{H}_7$ $\downarrow$ O	C_3H_7-	128
<i>S</i> -Allyl-L-cysteinsulfoxyd	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}\rightarrow\text{O}$ $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}$	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$	132
<i>S</i> -Benzyl-L-cysteinsulfoxyd	 		152

Tab. 1. Zusammenstellung der untersuchten *S*-Alkyl-L-cystein-sulfoxyde sowie ihrer enzymatischen Spaltprodukte und der daraus hergestellten Thiaminderivate.

Serin, Homoserin, Homocystein, Methionin und Methyl-sulfonium-methionin werden durch das Albizzia-Enzym nicht angegriffen.

Unsere Untersuchungen über Eigenschaften des Albizzia-Enzyms mußten sich aus technischen Gründen vorläufig auf das Rohenzym beschränken.

Die Untersuchungen brachten folgende Ergebnisse:

a) Das Enzym hat ein p_{H} -Optimum von 8,5 und eine Wirkungsbreite zwischen p_{H} 5,5 und 11,5.

b) Das Enzym hat ein Temperatur-Optimum bei 37°C. Es wird durch Hitze inaktiviert. Unterhalb 0°C findet keine Spaltung des Substrats statt.

Abb. 6. Abhängigkeit der Aktivität des Albizzia-Enzyms von der Temperatur. Einzelansätze mit je 100 mg *S*-Methyl-L-cystein in 20 ml Boratpuffer (p_{H} 8,5) + 50 mg Rohenzym. Versuchsdauer 2 Stunden.

c) Das Rohenzym läßt sich ohne Wirkungsverlust (Gegensatz zu Alliinase) aus der wäßrigen Lösung durch Alkohole oder Aceton ausfällen. Im getrockneten Zustand ist es sehr stabil, aber auch Lösungen in Boratpuffer p_{H} 8 lassen sich bei nur mäßigem Verlust an Wirkung monatelang im Eisschrank aufbewahren.

d) Carbonylreagentien hemmen das Enzym. Durch HCN, Hydroxylamin, Hydrazin und Semicarbazid

Abb. 7. Einfluß von Glycine und Glutaminsäure auf die Aktivität des Albizzia-Enzyms. Einzelansätze mit je 100 mg *S*-Methyl-L-cystein und 100 mg Rohenzym in 20 ml Boratpuffer p_{H} 8,5; Versuchsdauer 2 Stunden.

erfolgt vollständige, durch Phenylhydrazin teilweise Hemmung.

e) Zusatz von Glycin zur Reaktionsmischung verringert die Spaltungsrate erheblich. Glutaminsäure dagegen ist ohne nennenswerten Einfluß.

f) Die Aktivität des Albizzia-Rohenzym lässt sich durch Zusatz von Pyridoxalphosphat steigern.

Abb. 8. Einfluß von Pyridoxalphosphat auf die Aktivität des Albizzia-Enzyms. Einzelansätze mit je 200 mg S-Methyl-L-cystein in 10 ml Boratpuffer pH 8,5; 10 mg Rohenzym pro Einzelansatz. Versuchsdauer 2 Stunden. Raumtemperatur.

Abb. 9 zeigt die enzymatische Spaltung von S-Methyl-L-cystein in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an Albizzia-Rohenzym.

Abb. 9. Einfluß der Enzymmenge auf die Spaltung von S-Methyl-L-cystein. Einzelansätze mit je 100 mg S-Methyl-L-cystein in 10 ml Boratpuffer pH 8,5. Dauer des Versuchs 2 Stunden.

Aus diesen Resultaten ist zu schließen, daß – analog zu Alliinase und anderen C–S-Lyasen – Pyridoxalphosphat das Coferment des Albizzia-Enzyms ist.

Systematisch ist das Albizzia-Enzym zu den C–S-Lyasen (HOFFMANN-OSTENHOF³⁹) zu zählen. Da es, je nach Substrat, gleichzeitig als Desulphydrase bzw. Cysteinase, als Thioätherase oder Thionase und als Alkylsulfoxydase fungiert, fällt es schwer, für das Enzym eine geeignete Sammelbezeichnung zu finden. Der Mannigfaltigkeit seiner Substrate wäre am ehesten die Bezeichnung „HS–RS–RSO-Cysteinase“ gerecht.

Die Frage der Nomenklatur ist jedoch erst akut, wenn nach Reindarstellung des Albizzia-Enzyms durch die Methoden der Proteinchemie seine Einheitlichkeit bewiesen worden ist und das einheitliche Enzym dann immer noch die genannten 3 Typen von Spaltungen durchführt.

Beschreibung der Versuche

Ia. Ausgangsmaterial

Albizzia lophantha-Samen* wurden zunächst grob gemahlen und von den Samenschalen (etwa 50% des Gesamtgewichts) abgetrennt. Die Endospermteile wurden feinst gemahlen und trocken aufbewahrt.

Ib. Substrate und chemische Substanzen**

L-Lanthionin und L-Lanthioninsulfoxyd wurden uns durch Prof. H. ZAHN, DL- und allo-Cystathionin, DL-Homoserin und Pyridoxalphosphat durch Dr. Y. MATSUO zur Verfügung gestellt**.

Ic. Die Darstellung von S-Methyl-, S-Äthyl-, S-Propyl-, S-Allyl- und S-Benzyl-L-cystein sowie von S-Methyl-DL-cystein erfolgte nach bekannten Methoden.

Durch Oxydation der S-Alkyl-cysteine mit 25-proz. H₂O₂ in Wasser nach STOLL und SEEBECK⁴⁰ wurden die entsprechenden, am S-Atom racemischen S-Alkyl-L-cysteinsulfoxyde dargestellt.

Tab. 2 enthält die Darstellungsmethoden und einige Daten der untersuchten Substanzen.

Id. Darstellung von Alliin

[(+)-S-Allyl-L-cysteinsulfoxyd] aus *Allium sativum* 100 g enthäutete Zwiebeln von *Allium sativum* wurden im Starmix mit 300 ml Methanol homogenisiert und die Mischung abgepreßt. Der Preßrückstand wurde nochmals in der gleichen Weise mit 70-proz. Methanol

³⁹ O. HOFFMANN-OSTENHOF, Enzymologie, Springer-Verlag, Wien 1954.

* Wir danken Herrn Prof. Dr. MARKGRAF (Botanischer Garten München-Nymphenburg), Herrn T. R. N. LOTHIAN (Botanischer Garten North Terrace, Adelaide) und dem Jardim E Museu Agricola Do Ultramar (Lissabon) für die freundliche Beschaffung des Samenmaterials.

** Herrn Prof. Dr. H. ZAHN (Deutsches Wollforschungsinstitut, Aachen) und Herrn Dr. Y. MATSUO (School of Medicine, Berkeley, Calif.) danken wir für die großzügige Überlassung wertvoller Substanzen.

⁴⁰ A. STOLL u. E. SEEBECK, Helv. chim. Acta 34, 481 [1951].

Aminosäure	Darstellung	Fp.	Optische Drehung	Rf-Werte, (absteigend, Schl. & Sch. 2043 b)	
				BEW 4:1:1	Pyridin-Butanol-H ₂ O 35 : 35 : 30
Djenkolsäure	a			0,06	0,05
S-Methyl-L-cystein	b c	216° C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} - 23,6$ (c = 1; H ₂ O)	0,35	0,35
S-Methyl-DL-cystein	b	216° C (Zers.)	—	0,35	0,35
S-Äthyl-L-cystein	b d	260° C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} - 22,8$ (c = 5; H ₂ O)	0,49	0,45
S-Propyl-L-cystein	e	242–243° C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} - 24,9$ (c = 2,5; H ₂ O)	0,60	0,55
S-Allyl-L-cystein	e	218° C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} - 16,4$ (c = 2,5; H ₂ O)	0,56	0,51
S-Benzyl-L-cystein	f	215–216° C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} + 19$ (c = 5; 1 n · NaOH)	0,72	0,69
S-Methyl-L-cysteinsulfoxyd	e	163° C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} - 28,8$ (c = 5; H ₂ O)	0,15	0,18
S-Äthyl-L-cysteinsulfoxyd	e	161° C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} - 16,6$ (c = 5; H ₂ O)	0,24	0,24
S-Propyl-L-cysteinsulfoxyd	e	150–152° C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} - 11$ (c = 2; H ₂ O)	0,32	0,31
S-Allyl-L-cysteinsulfoxyd	e	146–147° C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} - 10$ (c = 0,8; H ₂ O)	0,28	0,29
S-Benzyl-L-cysteinsulfoxyd	e	158–159° C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} 0$ (c = 2,1; 1 n · NaOH)	0,49	0,47

a loc. cit.³b V. DU VIGNEAUD, H. S. LORING u. H. A. CRAFT, J. biol. Chemistry **105**, 481 [1934].c H. T. CLARKE u. J. M. INOUE, J. biol. Chemistry **94**, 541 [1931/32].d M. D. ARMSTRONG u. J. D. LEWIS, J. org. Chemistry **16**, 749 [1951].e loc. cit.^{5a}f V. DU VIGNEAUD, L. F. AUDRIETH u. H. S. LORING, J. Amer. chem. Soc. **52**, 4500 [1930].

Tab. 2. Darstellungsmethoden und einige Daten der verwendeten Substrate.

behandelt. Die Filtrate wurden i. V. eingedampft, in 500 ml Wasser aufgenommen und die Lösung filtriert. Das Filtrat wurde durch eine Säule mit 50 ml Lewatit S 100 (H-Form) geschickt. Nach Waschen der Säule mit dest. Wasser wurde mit 2-proz. Ammoniak eluiert. Die alliinhaltigen Fraktionen wurden i. V. eingengt. Nach Auflösen des „Rückstandes“ in heißem 70-proz. Methanol, dem Aceton bis zur Trübung zugesetzt wurde, schied sich Alliin in feinen, langen Nadeln aus. Umkristallisation aus verdünntem Aceton. Ausbeute 108 mg Alliin [Schmp. 163–165° C (Zers.)]. Papierchromatographische Prüfung zeigte, daß das Präparat Spuren von S-Methyl-L-cysteinsulfoxyd enthielt.

II. Isolierung von Djenkolsäure aus den Samen von *Albizzia lophantha* Benth.

a) 100 g feinst gemahlene Samen von *Albizzia lophantha* wurden 3-mal mit je 500 ml 50-proz. Methanol

ausgekocht. Die Filtrate wurden von Methanol befreit, mit Wasser auf 1 l aufgefüllt und filtriert. Das Filtrat wurde auf eine Säule mit 100 ml Lewatit S 100 (H-Form) gebracht. Nach Waschen der Säule mit dest. Wasser wurde mit 2-proz. Ammoniak eluiert. Das gesamte Eluat wurde eingedampft. Bei vorsichtiger Wasserzugabe blieb ein weißer Niederschlag zurück, der abfiltriert und getrocknet wurde. Ausbeute 150 mg.

b) Wegen der geringen Ausbeute nach Methode II a wurden weitere 100 g Samen nach VAN VEEN und HYMAN⁴¹ aufgearbeitet.

Ausbeute 1,6 g Djenkolsäure.

C₇H₁₄N₂S₂O₄ Ber. C 33,06 H 5,54 N 11,01 S 25,21.
Gef. C 32,43 H 8,76 N 11,61 S 23,04.

⁴¹ A. G. VAN VEEN u. A. J. HYMAN, loc. cit.^{1b}.

III. Papierchromatographischer Nachweis der Djenkolsäure-Spaltung durch ein Enzym der Albizzia-Samen

Ansatz a. 1 g fein gepulverte Samen wurde mit 10 ml Wasser kalt angerührt.

Ansatz b. 1 g fein gepulverte Samen wurde mit 10 ml 50-proz. Methanol aufgekocht.

Ansatz c. 10 mg synthetische Djenkolsäure wurden in 5 ml Boratpuffer p_H 8,5 aufgeschlämmt und mit 100 mg Rohenzym versetzt.

Von den Ansätzen a, b und c wurden nach 0 Stdn. und nach 6 Stdn. je 20 μ l auf Bogen von Schleicher & Schüll 2043 b aufgetragen.

Entwicklungsflüssigkeit: Butanol-Essigsäure-Wasser 4:1:1. Absteigende Chromatographie. Sichtbarmachung durch Besprühen der getrockneten Chromatogramme mit Ninhydrinlösung (vgl. Abb. 1).

In gleicher Weise wie bei III c wurde mit Cystathionin verfahren (vgl. Abb. 2).

IV. Darstellung des Albizzia-Rohenzym

a) 100 g feinst gepulverte Samen von *Albizzia lophantha* wurden mit 400 ml Wasser angerührt. Nach mehrstdg. Stehen unter wiederholtem Umschütteln wurde die Mischung scharf zentrifugiert. Der abdekantierte, milchige Überstand wurde mit der 5-fachen Menge 96-proz. Alkohols versetzt und die Mischung zentrifugiert. Der schwach gelbliche Bodensatz wurde nach Abgießen der überstehenden Flüssigkeit 3-mal mit Aceton verrieben, abgesaugt und auf Tonteller getrocknet. Ausbeute 15 g Rohenzym: weißes, lockeres, nicht hygroskopisches Pulver.

b) Mit dem Rückstand des Samenpulvers wurde die Operation wiederholt. Ausbeute: 4 g eines gelblich-grauen Rohenzym von geringerer Aktivität als unter a.

V. Durchführung der Spaltungsreaktionen und Nachweis der enzymatisch gebildeten Spaltprodukte

100–200 mg der Aminosäuren wurden in 10–20 ml Boratpuffer p_H 8,5 gelöst und die p_H -Werte durch Zugabe von NaOH-Lösung auf p_H 8,5 eingestellt. Zugabe von 100 mg Albizzia-Rohenzym und Umschütteln bis zur Lösung des Enzyms.

a) Brenztraubensäure-Nachweis (qualitativ)

Die Reaktionsmischung wurde mit dem gleichen Volumen einer 20-proz. Trichloressigsäure-Lösung versetzt und filtriert. Zugabe zum Filtrat einer heißen 2-proz. Lösung von Dinitrophenylhydrazin in verdünnter Salzsäure. Die entstandene Fällung wurde nach 2-stdg. Stehen im Eisschrank abfiltriert und aus Eisessig umkristallisiert.

Brenztraubensäure-Dinitrophenylhydrazon: Schmp. 215–216° C.

b) Brenztraubensäure-Bestimmung (quantitativ)

Die Bestimmung erfolgte nach STOLL und SEEBECK⁴².

⁴² A. STOLL u. E. SEEBECK, l. c. 5b.

c) Ammoniak-Nachweis (qualitativ)

Die Reaktionsmischung wurde mit einem Tropfen Silikonöl versetzt und destilliert. Im alkalisch reagierenden Destillat wurde NH_3 durch Neßlers Reagenz nachgewiesen.

d) Ammoniak-Nachweis (quantitativ)

Ein nach c erhaltenes Destillat wurde in einer gemessenen Menge $n/10$ -HCl-Lösung aufgefangen. Rücktitration mit $n/10$ -NaOH-Lösung gegen Methylrot.

e) Nachweis gebildeter Thiole

1. Die Reaktionsmischung wurde mit einigen Tropfen einer Jodazid-Lösung (Lösung von 100 mg Natriumazid in einer Mischung aus gleichen Teilen Alkohol und $n/10$ -Jodlösung) versetzt. Die Reaktion wurde als positiv angesehen, wenn unter stürmischer Gasentwicklung spontane Entfärbung eintrat.

2. Zugabe einer alkalischen Lösung von Nitroprussid-Natrium: rotviolette Färbung bei Anwesenheit freier SH-Gruppen.

3. Geruchsprobe:

CH_3-SH und C_2H_5-SH „kohlartig“,
 C_3H_7-SH und Allyl-SH „knoblauchartig“

4. H_2S -Nachweis

Destillation der Reaktionsmischung bei schwach saurem p_H und Auffangen des Destillats in $AgNO_3$ - oder $Pb(NO_3)_2$ -Lösung.

5. Nachweis von Mercaptanen

Destillation der Reaktionsmischung bei schwach saurem p_H und Auffangen des Destillats in $HgCl_2$ - oder Kupferacetat-Lösung.

VI. Isolierung von Benzylthiosulfinsäurebenzylester

1 g S-Benzyl-L-cysteinsulfoxyd wurde in 100 ml Boratpuffer p_H 8,5 aufgelöst. Zugabe von 1 g Rohenzym. Nach wenigen Min. setzte Ausscheidung von Benzylthiosulfinsäurebenzylester ein, die nach etwa 4 Stdn. beendet war. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und nach Trocknen aus Äther-Petroläther umkristallisiert.

0,46 g schöne, durchsichtige rhombische Kristalle von brennend-scharfem Geschmack. Schmp. 81–83° C.
 $C_{14}H_{14}OS_2$ Ber. C 64,08 H 5,39 S 24,44.
 Gef. C 63,85 H 5,39 S 24,00.

VII. Umsetzung von Alkylthiosulfinsäurealkylestern mit Thiamin

1 g S-Methyl-(Äthyl-, Propyl-, Allyl- und Benzyl-)L-cysteinsulfoxyd wurde in Boratpuffer p_H 8,5 aufgelöst. Zugabe von 0,5 g des Rohenzym. Die Mischung wurde unter wiederholtem Umschütteln 4 Stdn. bei Raumtemperatur gehalten. 3-maliges Ausschütteln mit Chloroform und Trocknen der Chloroformphasen über Na_2SO_4 . Nach Abdestillieren des Chloroforms i. V. blieben farblose Öle zurück, die brennend scharf schmeckten. Sie wurden in wenig Alkohol gelöst und zu einer neutralisierten Lösung von Thiamindihydrochlorid

rid gegeben. Die Umsetzung erfolgte nach MATSUKAWA⁴³ u. a. (Schmp. s. Tab. 1).

VIII. Bestimmung der Enzymaktivität gegenüber verschiedenen Substraten

Von S-Methyl-(Äthyl-, Propyl-, Allyl- und Benzyl-)L-cystein bzw. den entsprechenden Sulfoxiden wurden 25 ml einer 1/20-molaren Lösung in Boratpuffer p_H 8,5 mit je 100 mg Rohenzym versetzt und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach 2, 4, 6 und 24 Std. wurden mit je 5 ml der einzelnen Ansätze Brenztraubensäure gravimetrisch oder Ammoniak titrimetrisch bestimmt.

IX. Bestimmung der Enzymaktivität unter verschiedenen Bedingungen (Pyridoxylphosphat-Zusatz, unterschiedliche Temperaturen, Glycin- und Glutaminsäure-Zusatz, verschiedene p_H -Werte, Inhibitoren)

Die einzelnen Bestimmungen wurden wie unter VIII. durchgeführt. Abänderungen in den Einwaagen und Versuchsbedingungen sind aus den jeweiligen Abbildungen zu entnehmen.

⁴³ T. MATSUKAWA, I. c. ³⁸.

X. Gewinnung von S-Methyl-D-cystein aus S-Methyl-DL-cystein

2 g S-Methyl-DL-cystein wurden in 100 ml Boratpuffer p_H 8,5 gelöst und mit 1 g Rohenzym versetzt. Die Mischung wurde 6 Std. bei 35° C gehalten, abschließend kurz zum Sieden erhitzt und von ausgeschiedenem Enzym abfiltriert. Nach Auffüllen der Mischung mit Wasser auf etwa 500 ml wurde die Lösung durch eine Säule mit 50 ml Zeo Carb 215 (H-Form) geschickt. Der Gesamt-Durchlauf wurde zur Bestimmung gebildeter Brenztraubensäure mit überschüssiger Dinitrophenylhydrazin-Lösung in verdünnter Salzsäure versetzt. Die Bestimmung ergab eine 40-proz. Spaltung bezogen auf die DL-Form.

Die Säule wurde anschließend mit Wasser nachgewaschen und dann mit 2-proz. Ammoniak eluiert. Das Eluat wurde i. V. eingedampft und der Rückstand aus verdünntem Alkohol umkristallisiert. Glitzernde Kristallblättchen. Schmp. 220° C (Zers.). Ausbeute 0,35 g (35% der Theorie).

$C_4H_9O_2NS$ Ber. C 35,6 H 6,67 N 10,37 S 23,7.

Gef. C 35,62 H 6,64 N 10,0 S 22,15.

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{25} -28,1^\circ$ ($c=2$; H_2O)

Die Mikroanalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium A. BERNHARDT, Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim/Ruhr durchgeführt.

Untersuchungen am Vaccine-Virus

V. Mitt.: Elektronenoptische Studie über den Pepsin-Abbau des Elementarkörpers bei Variation von Fixierung und p_H -Wert

Von DIETRICH PETERS

Aus der Abteilung für Virusforschung des Bernhard Nocht-Institutes für Schiffs- und Tropenkrankheiten, Hamburg (Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. E. G. NAUCK)
(Z. Naturforschg. **12 b**, 697—703 [1957]; eingegangen am 3. Juli 1957)

Frühere Angaben über den Aufbau des Elementarkörpers ließen sich durch Anwendung weiterer Fixierungsmethoden stützen. Die durch Osmiumtetroxyd induzierte Resistenz der Elementarkörper gegenüber Pepsin wird durch Zugabe von L-Cystein aufgehoben. Der im Zentrum der DNS-haltigen Ringstruktur liegende Körper ist besonders im schwach sauren Bereich (p_H 3,0—4,5) gegen Pepsin resistenter als die periphere Schicht; er ist daher unter diesen Bedingungen regelmäßig sichtbar.

Vorausgegangene Studien hatten ergeben, daß nach Chabaud-Fixierung und Pepsinbehandlung die Desoxyribonucleo-Proteide (DN-Proteide) der Elementarkörper (Elk.) des Vaccine-¹ und des Molluscum contagiosum-Virus² vorwiegend ringförmig angeordnet sind. Sie sind demnach nicht Bestandteil der in unbehandelten Partikeln vorhandenen zentralen Verdichtung (s. Abb. 3); letztere wird durch Pepsin unter den angegebenen Normalbedingungen

weitgehend abgebaut. Trotz der Empfindlichkeit gegenüber Pepsin können Reste dieser Verdichtung neben dem desoxyribonucleinsäure (DNS)-haltigen Material sichtbar bleiben, wenn man den Pepsinabbau nur unvollständig ablaufen läßt. Es findet sich dann deutlich differenziert am Ort der zentralen Aufhellung des DNS-haltigen Ringes ein runder Körper. Der Elk. des Vaccine-Virus besteht demzufolge aus mindestens vier strukturell unterscheid-

¹ D. PETERS u. W. STOECKENIUS, Proc. 3rd. Int. Conf. Electron Microscopy, London 1954, S. 237, 1956; W. STOECKENIUS u. D. PETERS, Z. Naturforschg. **10 b**, 77 [1955].

² D. PETERS u. W. STOECKENIUS, Z. Tropenmed. Parasitol. **5**, 329 [1954].