

CENTRAL LIBRARY

**Birla Institute of Technology & Science
PILANI (Rajasthan)**

Call No.	574.1925
	A244
	v. 10
Accession No.	34974

ADVANCES IN ENZYMOLOGY
AND RELATED SUBJECTS OF
BIOCHEMISTRY

Volume X

CONTRIBUTORS TO VOLUME X

- TAGE ASTRUP, *Carlsbergfondets Biologiske Institut, Copenhagen, Denmark*
- THEODOR BERSIN, *Universitätsstrasse 52, Marburg/Lahn, Germany*
- NORMAN G. BRINK, *Research Laboratories, Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey*
- M. DOUDOROFF, *Department of Bacteriology, University of California, Berkeley 4, California*
- KARL FOLKERS, *Research Laboratories, Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey*
- WALTER G. FRANKENBURG, *Research Laboratory, General Cigar Company, Inc., Lancaster, Pennsylvania*
- FRANK C. HAPPOLD, *Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Leeds, England*
- W. Z. HASSID, *Division of Plant Nutrition, University of California, Berkeley 4, California*
- F. LYNEN, *Chemisches Universitäts-Laboratorium, München 2NW, Germany*
- C. MARTIUS, *Physiologisch-Chemisches Institut, Universität Tübingen, Germany*
- NGUYEN-VAN THOAI, *Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris, France*
- JEAN ROCHE, *Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris, France*
- CLAUDE E. ZOBELL, *Scripps Institution of Oceanography, University of California, La Jolla, California*

ADVANCES IN ENZYMOLOGY

AND RELATED SUBJECTS OF BIOCHEMISTRY

Edited by F. F. NORD
FORDHAM UNIVERSITY, NEW YORK, N. Y.

VOLUME X

1950
INTERSCIENCE  PUBLISHERS, INC.

NEW YORK
INTERSCIENCE PUBLISHERS LTD., LONDON

Copyright, 1950, by
INTERSCIENCE PUBLISHERS, INC.

All Rights Reserved

This book or any part thereof must not be reproduced without permission of the publisher in writing. This applies specifically to photostat and microfilm reproductions.

INTERSCIENCE PUBLISHERS, INC.

215 Fourth Avenue, New York 3, N. Y.

For Great Britain and Northern Ireland:

INTERSCIENCE PUBLISHERS LTD.

2a Southampton Row, London, W. C. 1

Printed in the United States of America
by Mack Printing Company, Easton, Pa.

CONTENTS

Blood Clotting and Related Processes. By TAGE ASTRUP, <i>Copenhagen, Denmark</i>	1
I. Introduction.....	1
II. Activation of Coagulation.....	3
A. Thromboplastin.....	3
B. Plasma Thromboplastin and Autocatalysis.....	7
C. The Role of Calcium.....	13
D. New Techniques.....	15
E. Determination of Prothrombin.....	17
F. Prothrombin and Thrombin.....	20
G. Factor 5 or the Accelerator Factor.....	23
III. The Clotting Process.....	29
A. Fibrinogen.....	29
B. Clotting of Fibrinogen.....	30
IV. Inhibition of Coagulation.....	33
A. Heparin.....	34
B. Antithrombin and Heparin.....	35
V. Conclusion.....	38
References.....	39
Tryptophanase-Tryptophan Reaction. By FRANK C. HAPPOLD, <i>Leeds, England</i>	51
I. Introduction.....	51
II. Early Studies on Mode of Formation of Indole.....	55
A. Introductory Studies on Mechanism.....	55
B. Nature of the Cell-Free Enzyme.....	60
C. Further Studies on Mechanism.....	62
III. Preparation and Properties of the Cell-Free Enzyme.....	65
A. Michaelis Constant.....	65
B. Effect of pH.....	66
C. Effect of Enzyme Concentration.....	66
D. Heat of Activation of Tryptophan → Indole Reaction in Presence of Tryptophanase.....	66
IV. Metal Catalysis of Indole Production.....	68
V. Inhibitors.....	69
Effect of Various Cations.....	70
VI. Indole and the Synthesis of Tryptophan.....	71
VII. Inhibition of Indole Production in Culture by Fermentable Carbohydrate.....	74
Specific Inhibition of Indole Production by <i>Escherichia coli</i> in Presence of Phenylalanine or Tyrosine and Glucose in Simple Media.....	77
References.....	81
Phosphatase Alcaline. Par JEAN ROCHE et NGUYEN-VAN THOAI, <i>Collège de France, Paris</i>	83
I. Introduction Générale.....	84
A. Existence de pH optima multiples des actions phosphatasiques. Signification.....	84
B. Phosphatases acides et phosphatases alcalines.....	85
C. Spécificité de la phosphatase alcaline.....	86

II. Identification, préparation, et purification de la phosphatase alcaline	89
III. Effecteurs de la phosphatase alcaline	94
A. Inhibition et inactivation	94
B. Activation	98
C. Spécificité d'organe et effecteurs	104
D. Effecteurs et activité synthétisante	105
IV. Sur la constitution de la phosphatase alcaline	107
A. Dissociation et reconstitution de la phosphatase alcaline	108
B. Réactivation de la phosphatase alcaline au moyen d'effecteurs	110
C. Hypothèses sur la constitution de la phosphatase alcaline	112
V. Conclusions générales	117
Bibliographie	118
Synthesis of Disaccharides with Bacterial Enzymes. By W. Z. HASSID and M. DOUDOROFF, <i>Berkeley, Calif.</i>	123
I. Introduction	123
II. Preparation of the Enzymic Extract from <i>Pseudomonas saccharophila</i>	124
III. Synthesis of Sucrose through Mechanism of Phosphorolysis	126
IV. Specificity of Sucrose Phosphorylase	129
V. Structure of Synthetic Disaccharides	131
A. Synthetic Sucrose	131
B. α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranoside	132
C. α -D-Glucopyranosyl- β -D-xyloketofuranoside	134
D. D-Glucosyl-L-araboketoside	135
E. 3-[α -D-Glucopyranosyl]-L-arabinopyranose	136
VI. Formation of Sucrose and Other Disaccharides through Exchange of Glycosidic Linkages	138
VII. Relation of Sucrose Phosphorylase to Polysaccharide Synthesizing Enzymes	140
References	142
Some Aspects of Streptomycin and Other <i>Streptomyces</i> Antibiotics. By NORMAN G. BRINK and KARL FOLKERS, <i>Rahway, N. J.</i>	145
I. Introduction	145
II. Streptomycin	146
A. Isolation	146
B. Nomenclature	147
C. Molecular Formula and Properties	149
D. Streptidine	149
E. Derivatives of Streptobiosamine	151
F. N-Methyl-L-Glucosamine	152
G. Streptose	152
H. Stereochemistry of Streptose	154
I. Structure of Streptobiosamine	154
J. Linkage between Streptidine and Streptobiosamine	155
K. The Maltol Rearrangement	156
L. Synthesis of N-Methyl-L-Glucosamine	157
M. Syntheses of Streptamine and Streptidine	158
N. Relationship of Structure of Streptomycin to Antibiotic Activity	160
O. A Site of Action of Streptomycin	161
III. Mannosidostreptomycin	161
IV. Chloromycetin (Chloramphenicol)	162
V. Aureomycin	164
VI. Neomycin	164
References	164

Probleme des Citronensäurecyklus. Von C. MARTIUS, <i>Tübingen</i> , und F. LYNEN, <i>München</i>	167
I. Einleitung.....	167
II. Citronensäurecyklus und Acetatabbau in der Hefe.....	169
A. Die Bildung von Citronensäure in Hefe.....	169
B. Versuche über den Abbau von Citronensäure und C ₄ -Dicarbon- säuren in Hefe.....	173
Über den Abbau der Essigsäure im Tierkörper.....	176
III. Der Mechanismus der Kondensationsreaktion.....	177
A. Nachweis einer "Aktivierung" der Essigsäure.....	177
B. Nachweis eines "aktiven" 2C-Fragmentes beim Pyruvatabbau in tierischem Gewebe.....	180
C. Citronensäurebildung aus Acetessigsäure und anderen β -Keto- säuren.....	182
D. Die Oxydation der Fettsäuren.....	186
E. Die Natur der "aktivierten" Essigsäure.....	188
IV. Aconitase.....	190
A. Einleitung.....	190
B. Vorkommen, Eigenschaften und Beeinflussung des Fermentes..	191
C. Substrate und Kinetik der Aconitase.....	192
D. Der "unsymmetrische" Abbau der Citronensäure.....	196
V. Oxalbernsteinsäure—Ochoa-Reaktion.....	199
A. Darstellung und Eigenschaften der Oxalbernsteinsäure.....	199
B. Oxalbernsteinsäure-Carboxylase.....	202
C. Carboxylierung von α -Ketoglutar säure zu Oxalbernsteinsäure (Ochoa-Reaktion).....	208
VI. Effektoren der Fermente des Citronensäurecyklus.....	213
Literatur.....	217
Nachtrag bei der Korrektur.....	221
Die Phytochemie des Schwefels. Von THEODOR BERSIN, <i>Marburg/ Lahn, Germany</i>	223
Einleitung.....	223
I. Elementarer Schwefel, Sulfate, und Polythionsäuren.....	229
II. Schwefelwasserstoff.....	232
III. Schwefelsäureester, Sulfosäuren, Sulfit, Thioäther, Sulfoxyde, Thio- aldehyde.....	234
A. Schwefelsäureester.....	234
B. Sulfonsäuren.....	236
C. Sulfit.....	236
D. Thioäther.....	238
E. Stickstofffreie alicyclische Disulfide und Sulfoxyde.....	257
F. Thioaldehyde.....	259
IV. Thioharnstoffe und Senföle.....	260
A. Thioharnstoffe.....	260
B. Senföle.....	262
V. Die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin, Cystathionin, Cystein, und Cystin.....	268
VI. Schwefelhaltige Peptide und Proteine.....	284
A. Schwefelhaltige Polypeptide.....	288
B. Schwefelhaltige Proteine.....	297
VII. Am Schwefelstoffwechsel beteiligte Enzyme.....	306
A. Schwefelspezifische Redoxasen.....	306
B. Sulfatasen.....	310
Literatur.....	311

Chemical Changes in the Harvested Tobacco Leaf. Part II. Chemical and Enzymic Conversions during Fermentation and Aging. By WALTER G. FRANKENBURG, <i>Lancaster, Pa.</i>	325
I. Chemical Changes Caused by Shed Curing.....	326
II. Description of the Fermentation and Aging Process.....	327
A. Types of Processing.....	327
B. External Symptoms of the Fermentation.....	333
1. Qualitative Changes.....	333
2. Quantitative Effects.....	335
III. Chemical Changes in Tobacco Leaves Caused by Fermentation and by Aging.....	357
A. Analytical Methods.....	357
B. The Sweat of Cigar Leaf Tobaccos.....	358
Techniques of Cigar Leaf Fermentation.....	358
C. Analytical Results.....	361
1. Loss of Weight.....	361
2. Changes of Non-nitrogenous Leaf Components.....	363
3. Insolubilization of Water-Soluble Leaf Components.....	375
4. Nitrogenous Compounds.....	376
5. Summary of the Chemistry of Cigar Leaf Fermentation..	398
D. Aging of Flue-Cured Cigarette Tobacco.....	399
1. Composition Prior to Aging.....	399
2. Technique of Aging.....	400
3. Analytical Results.....	401
IV. Hypotheses Concerning the Causative Agents of Tobacco Fermentation.....	409
A. The Problem.....	409
B. The Development of Various Hypotheses.....	409
1. First Period: 1858-1900.....	409
2. Second Period: 1901-1933.....	412
3. Third Period: 1935 up to the Present.....	415
C. The Present Picture.....	425
1. Relationship between the Various Mechanisms.....	425
2. Presumable Mechanisms of Some Individual Conversions Occurring in Fermentation and Aging.....	428
V. Effect of Fermentation on Smoking Properties.....	433
References.....	434
Assimilation of Hydrocarbons by Microorganisms. By CLAUDE E. ZOBELL, <i>La Jolla, Calif.</i>	443
I. Introduction.....	444
II. Experimental Methods.....	445
A. Modification of Hydrocarbons.....	445
B. Microbial Multiplication.....	446
C. Oxygen Uptake.....	446
D. Methylene Blue Reduction.....	447
E. Carbon Dioxide Production.....	447
F. Nitrate and Sulfate Reduction.....	448
G. Methods of Dispersing Hydrocarbons in Medium.....	448
III. Occurrence of Hydrocarbon-Oxidizing Organisms.....	449
IV. Action of Hydrocarbons on Microorganisms.....	451
A. Antiseptic Hydrocarbons.....	451
B. Selective Action of Hydrocarbons.....	452
C. Preservation of Cultures under Oil.....	453
V. Microbial Oxidation of Gaseous Hydrocarbons.....	454
VI. Relative Oxidizability of Different Classes of Hydrocarbons.....	456
A. Aliphatic <i>vs.</i> Aromatic Compounds.....	456
B. Effect of Chain Length on Oxidizability of Hydrocarbons.....	457
C. Effect of Unsaturation or Double Bonds.....	459

D. Effect of Branching or Side Chains	460
E. Polycyclic Hydrocarbons	461
VII. Action of Microorganisms on Hydrocarbon Derivatives	462
VIII. Products of Hydrocarbon Oxidation	464
A. Cell Substance	464
B. Carbon Dioxide	465
C. Organic Acids	466
D. Aldehydes	467
E. Alcohols and Oxyphenols	467
F. Modified Hydrocarbons and Pigments	469
IX. Microbial Modification of Petroleum and Its Products	470
A. Rate of Oxidation of Oil	471
B. Extent of Change	472
C. Petroleum Products	473
X. Microbial Decomposition of Rubber Hydrocarbons	474
XI. Assimilation of Hydrocarbons by Animals	476
A. Paraffinic Hydrocarbons	476
B. Aromatic Hydrocarbons	477
XII. Production of Hydrocarbons by Microorganisms	478
XIII. Summary and Conclusions	479
References	481
Author Index	487
Subject Index	515
Cumulative Index of Volumes I-X	521

BLOOD CLOTTING AND RELATED PROCESSES

By TAGE ASTRUP, *Copenhagen, Denmark*

CONTENTS

I. Introduction.....	1
II. Activation of Coagulation.....	3
A. Thromboplastin.....	3
B. Plasma Thromboplastin and Autocatalysis.....	7
C. The Role of Calcium.....	13
D. New Techniques.....	15
E. Determination of Prothrombin.....	17
F. Prothrombin and Thrombin.....	20
G. Factor 5 or the Accelerator Factor.....	23
III. The Clotting Process.....	29
A. Fibrinogen.....	29
B. Clotting of Fibrinogen.....	30
IV. Inhibition of Coagulation.....	33
A. Heparin.....	34
B. Antithrombin and Heparin.....	35
V. Conclusion.....	38
References.....	39

I. Introduction

The need in these series for a review on the processes related to blood coagulation only a few years after Chargaff (52) published his paper is a sign of the rapid development of our knowledge in the field during recent years. Part of this work has been carried out in Europe during and after the last war, and has been published in journals not readily available to all investigators. Emphasis will therefore be laid upon the presentation of such work. It is not the purpose to give a comprehensive treatment of the whole field. The reader is referred here to the appropriate *Annual Reviews* and abstracting journals, as well as to a number of monographs (9,38,122,162,217,233,239,263,282,300) covering various aspects of the field.

It may be worth while first to look briefly on the development of our understanding of the mechanism of blood clotting. Four periods may be distinguished as such:

The *first period* of experimental work on blood clotting started in 1856 with the discovery of fibrinogen by Denis. After the investigations of Alexander Schmidt, O. Hammarsten, Arthus and Pages,

Fuld and Spiro, and Morawitz, this period ended in 1904 with the formulation of the well-known "classical scheme" of blood coagulation. (In this paper the terms "thromboplastin" and "thromboplastinogen" are preferred for "thrombokinase" and "prothrombokinase" in order to distinguish more easily between such terms as "prothrombokinase" and "prothrombin"—(cf. Quick, 250).)

(I) *First phase*: prothrombin + thromboplastin + Ca^{++} \longrightarrow thrombin

(II) *Second phase*: thrombin + fibrinogen \longrightarrow fibrin

The work carrying to this conception was excellently reviewed by Morawitz (209).

Various problems concerning blood coagulation were not explained through the classical scheme. This was the case with the properties of the thromboplastin as a water-soluble substance or as a lipide (Bordet, Howell, Zak) and the action of inhibitory substances. In order to incorporate the last-mentioned substances, especially after the discovery of heparin, Howell changed the scheme to a three-phase sequence in which an inhibitor is first removed from prothrombin, which then undergoes activation solely under the influence of calcium ions. The action of chloroform and the dissolution of the fibrin formed (fibrinolysis) also made difficulties and influenced especially the conceptions of Nolf. In America, Mills resumed an older theory according to which the tissue factor (termed by Mills as "tissue fibrinogen") reacts directly with fibrinogen to form fibrin. In Europe, a serious confusion arose by the introduction in an erroneous manner of physical chemistry and colloid chemistry into blood clotting. The presence of a purely colloidal phenomenon (a sol-gel transformation) in the clotting so fascinated most of the observers that they forgot that for the reaction mechanism itself the character of the resulting end-product is of no importance. This situation is clearly reviewed by Wöhlisch (319), and in 1935 Howell (144) wrote: "One seeks in vain to reconcile these views or to reduce them to a common basis." Thus ended *the second period*.

At this juncture some American investigators—Smith, Warner, and Brinkhous (286), 1934; Quick (243), 1935; and Eagle (76), 1935—published their studies rejecting the ideas of Mills and denying the fundamental role of the inhibitory substances of Howell, thus returning to the classical conception. They were soon followed by Ferguson (94), while in Europe J. Bordet, J. Mellanby, and Wöhlisch,

in particular, had kept to the classical conception. In a few years the tide turned and the discovery, especially, of vitamin K by Dam, and the possibility of explaining its action in terms of the classical conception, served to furnish the proof that the classical scheme could be used with advantages as a basis for further understanding. The clearing up of the situation is evident from the review of Wöhlisch (320) in 1940.

This *third period* may be said to have ended in 1943. In this year Quick (246) found that prothrombin was not a single substance but a complex. In 1944, Owren (232) described a hemorrhagic disease, caused by the lack of a previously unknown coagulation factor, termed by him "factor 5" (see also Section IIG). Since then a large amount of work has accumulated showing that the mechanism of blood clotting is far more complicated than expected a few years ago and as expressed in the classical theory. Further, the antithrombic action has been largely elucidated and the mechanism of fibrinolysis cleared up, in the main. We are still in a period of rapid development, but it seems possible to incorporate all new facts in the classical theory by minor alterations and improvements. Of the important workers, only Nolf (1938 (221)) still adheres to a different conception, but unquestionably his experimental material should be reinvestigated and reevaluated in the light of the recent development concerning the fibrinolytic enzymes in blood and the accelerator factor.

We are for the present sailing on uncharted streams and we do not know where and how far they will carry us before *this fourth period* has ended. But let us keep in sight our landmarks and in looking back remember the warning expressed by O. Hammarsten fifty years ago (136):

"Die Lehre von der Faserstoffgerinnung hat leider schon gar zu viele unrichtige oder unbewiesene Theorien aufzuweisen, und der Grund hierzu liegt zum grossen Teil darin, dass man aus richtigen Beobachtungen seine Schlussfolgerungen oft zu rasch und ohne genügende Vorsicht gezogen hat."

II. Activation of Coagulation

A. THROMBOPLASTIN

The activating tissue factor, thrombokinase (or thromboplastin), is now known to be a complex between a lipid substance and a protein, and this explains many of its properties (*e.g.*, its solubility in aqueous solution, and the presence in alcoholic extracts of an active

lipoid substance). The lipide component was originally thought to be cephalin, but later experiments showed it to be an alcohol-soluble factor—see Chargaff (52) and Widenbauer and Reichel (312). The protein moiety has been only slightly investigated (105,202). The most thorough investigation of the chemical properties of thromboplastin has been made by Chargaff and need not be mentioned here. It should be pointed out, however, that Chargaff uses the term *thromboplastic lipide* for the thromboplastic agent soluble in lipide solvents, while in his terminology *thromboplastic protein* is the water-soluble, active thromboplastic agent, viz., the substance termed *thromboplastin* (in English and American Literature) or *thrombokinase* (in continental literature). It should not be confused with the separated, inactive protein moiety of the thromboplastin complex.

The relation of the clotting time to the amount of thromboplastin added to a given sample is the most often investigated of the properties of thromboplastin. Fuld (116) was the first to make such an investigation. He used avian plasma and came to the conclusion that the so-called "Schütz law" was valid. However, it was shown by Astrup (5,9) that Fuld and later authors used this rule in an erroneous manner. Fischer (108) showed the following formula to be valid for the clotting of avian plasma by means of avian thromboplastin:

$$(I) \quad 1/t = kc^a \quad \text{or}$$

$$(II) \quad \log t = -a \log c - b \quad (\text{when } b = \log k)$$

where t is the clotting time, c is the amount of thromboplastin, and k , a , and b are constants for the given system. Similar relations had already been found to exist for the clotting of citrated and oxalated mammalian plasma with thrombin by Barratt (26) and Kugelmass (171). Mills (202) had found the same equation for the clotting of recalcified, oxalated plasma by means of the tissue factor. It was used by Astrup and Darling (13) for investigations on lung thromboplastin and by Astrup (9) for brain thromboplastin. Jaques (152) and Astrup (9) used it for the clotting of fibrinogen by thrombin.

This equation has a wide range of validity not only in blood clotting but for many biological phenomena. It must be remembered that it is an empirical equation, which does not indicate any mechanism of

reaction, and it can be used only as a convenient tool for describing experimental results.

The validity of the formula for the processes of blood coagulation has been treated thoroughly by Legler (179). He could show that the relation between prothrombin time and prothrombin concentration followed this equation. The action of ninhydrin on fibrinogen described by Chargaff and Ziff (59) follows this equation. He points out the possibility of standardizing thrombin with ninhydrin as a reference standard, but this will be possible only if it can be shown that the slopes of the double logarithmic curves (expressed in the constant a) are the same in both cases. Otherwise the actions are qualitatively different and cannot be compared.

The constant a in the equation (*e.g.*, the slope of the curve) is characteristic of the reacting system and independent of the units of time and concentration. The equation is very suitable for comparing the potencies of different samples of thromboplastin, and has been used for following the stability of lung thromboplastin (13) and brain thromboplastin (9,233). In a number of papers Bertrand and Quivy (31) have used the double logarithmic formula for investigating coagulation under different conditions. After addition of heparin, the slope is increased (Fischer, 108). Feissly (92) used the equation for the estimation of plasma thromboplastin. It seems that this equation is very convenient for comparative investigations in blood coagulation.

Interest continues to center around the nature and properties of thromboplastin, partly because its action in blood coagulation is still not completely understood, and partly because a potent and stable thromboplastin is necessary for clinical prothrombin determinations. The question has been treated by Chargaff (52) and only a few points will be added.

Kazal *et al.* (165) described horse brain as a convenient source of thromboplastin, although it was not as active as the rabbit thromboplastin generally used. Watery suspensions were very unstable but could be stabilized by adding various antiseptics, while antioxidants were less active, thus indicating bacterial destruction of the suspension rather than oxidative processes (166). On the other hand, desiccated brain thromboplastin was kept most stable by adding antioxidants (167). A very stable thromboplastic extract can be obtained from placenta. Reichel (261) found this thromboplastin to be highly

potent and to be very heat-stable in aqueous suspension. It was found to be more heat-stable than the thromboplastic solution prepared from the thyroid, which was known to be rather heat-stable.

According to Wöhlisch (320), the heat stability of struma (goiter) extracts was first shown by Schössmann (270). Such an extract has especially been used by Lenggenhager (181). Similar results with placenta extracts were obtained by Zondek and Finkelstein (104) and by Owren (233, p. 115). It may be added that the toxic principle present in placenta was found by Schneider (271) to be a placental thromboplastin. According to Studer (290), a potent soluble thromboplastin may be prepared by the interaction of an ether-alcohol extract of lung tissue with trypsin, which takes the place of the natural protein moiety of the thromboplastin molecule. In an interesting paper, the late William H. Howell (145) described the preparation of a heat-stable thromboplastin from pig lung and human lung. This is important because lung thromboplastin was found very labile by previous workers (*cf.* 13). Howell used several new features in his method (precipitation by means of trichloroacetic acid, treatment with calcium malonate solution) and, although unquestionably he recovered only a very small fraction of the total original activity as a stable product, his method needs consideration in future work on the preparation of thromboplastin. It is known that the action of thromboplastin is rather species-specific in that, *e.g.*, avian thromboplastin shows very little or no action on the clotting of mammalian plasma. The preparation of chick muscle thromboplastin was described by Fischer (106), who made a comparison between the potencies of various chick organs and found that lung tissue gave the most active extract (109). In experiments on chick plasma the chick embryo extract (8 days) used in tissue culture can be employed in very high dilution (*cf.* Astrup, 5).

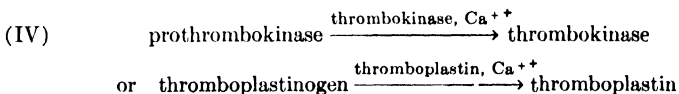
Thromboplastic activity is also found in body secretions such as human milk and saliva, where it may be decreased in hemophilia (Létard, 184). It has been reported as present in urine by Tocantins and Lindquist (297). The excretion in the urine of thromboplastin was described by Mills *et al.* (203). It is well known that in snake venoms substances acting as thromboplastin or thrombin are present, but these questions will not be dealt with here. A thromboplastic material is also found in yeast (Dyckerhoff, *et al.* (75)). Chargaff has contributed a series of papers on his thromboplastin investigations.

After removal of solid material from ox lung extract, by means of low-speed centrifugation, he was able to sediment the thromboplastic material with high-speed centrifugation (53). Human lung and placenta gave similar results (54). Schneider (271) sedimented thromboplastin from the following organs with high-speed centrifugation: rabbit uterus, human placenta, rabbit lung, rabbit brain, rabbit kidney, rabbit liver, and rabbit muscle. In the same manner the thromboplastic material in chick embryo juice can be sedimented (Fischer, 112). It is well known that the thromboplastic activity in most extracts is connected with particulate matters and may separate even at low-speed centrifugation. Quick (245) has investigated this problem.

Chargaff and West (58) further confirmed an observation by Macfarlane *et al.* (191) on the decreased coagulability of high-speed centrifuged plasma. They found that a thromboplastic agent separated from oxalated plasma, and that the amount of this substance was decreased in hemophilia. This observation gains in importance in view of the growing evidence of the presence of a precursor of thromboplastin (thromboplastinogen, prothrombokinase) in undisturbed plasma, which can be converted into an active plasma thrombokinase (equation III):



The significance of this concept lies in the possibility of explaining the so-called autocatalytic process in blood clotting by means of an autocatalytic formation of the plasma thrombokinase (equation IV):



B. PLASMA THROMBOPLASTIN AND AUTOCATALYSIS

An accelerated formation of thrombin during the clotting process was first noticed by Arthus (3) and soon confirmed by Bordet and Gengou (42). The latter also showed that the process could be repeated in fresh plasma by transferring a small amount of the mixture undergoing clotting to the fresh plasma sample. This was confirmed by Gratia (129), and later Fischer (110) rediscovered the phenomenon. He used chick plasma and showed that the reaction could be transferred to fresh plasma as many times as technical difficulties would

permit, and that the amount of thrombokinase added originally would soon be so diluted during these repeated passages as to be of no importance for the clotting. At first it was thought that the autocatalytic formation of thrombin from prothrombin was responsible for this process, resembling the known autocatalytic formation of pepsin and trypsin from their respective precursors (115,130). An investigation by Astrup (6) of the processes concerned in coagulation, however, showed beyond doubt that neither the conversion of fibrinogen into fibrin nor the conversion of prothrombin into thrombin as such is an autocatalytic reaction. Fischer and Astrup both worked with chick plasma. Avian plasma is especially suited for these investigations because no addition of anticoagulants is needed to keep the plasma fluid. In this manner the delicate system present in plasma and blood is left undisturbed. In the paper mentioned (6) it was pointed out that the formation of increasing amounts of thrombin in a mixture undergoing coagulation is in itself no proof of an autocatalytic process, but that the indefinite transferring of samples to new fresh media is the only final proof of such a reaction.

In a later study, Astrup (9, p. 43) showed that the substance formed autocatalytically in fresh plasma is not thrombin, as it will not clot oxalated plasma. It was concluded that it is not an *active* substance (thrombin) which is the cause of the autocatalytic reaction, but that an *activating* substance that can convert prothrombin into thrombin, is present in fresh plasma as a precursor, and may be transformed autocatalytically into the activating substance. It is pointed out that the autocatalytic reaction occurs before the conversion of prothrombin into thrombin and the action of thrombin on fibrinogen, and it is suggested that the transformation of a prothrombokinase present in plasma to an activating plasma thrombokinase may be the cause of this reaction (equation IV).

Thus blood plasma evidently contains in itself all the substances necessary for blood clotting—even the thromboplastic agent. This has especially been emphasized by Nolf (219), who was one of the first to see the incompleteness of the classical theory of blood clotting in explaining all accumulated experimental facts. He shares the opinion of Bordet and Gengou about the autocatalytic reaction. Also, Wöhlisch (320) considered in his excellent review the possible role of an autocatalytic reaction during blood clotting.

The accumulating evidence for an autocatalytic reaction has

gained in importance, since it seems probable that the solution to the riddle of hemophilia lies in this reaction. The elucidation of the problem, however, has been complicated by the discovery of the new factor accelerating the formation of prothrombin (factor 5, accelerator factor, labile factor). While this factor will be treated under prothrombin we will try here to collect the material pointing to the presence of a prothrombokinase or thromboplastinogen, keeping in mind that all these investigations must be reconsidered in the light of the new accelerator factor.

Bordet and Delange (39) in 1921 investigated the formation of thrombin, and showed that dilution and CO₂ treatment of plasma produced a precipitate which was able to activate prothrombin in serum to thrombin. They explained in this manner what Bordet had previously termed *l'excito-production* of thrombin. They suggested that the plasma ("salt-plasma," where the clotting is prevented by adding an excess of sodium chloride, 5%) contained a thromboplastic agent extracted from the platelets. It is possible to make similar experiments when using oxalated plasma, providing centrifugation has not been too rapid. This is a very interesting observation in view of the centrifuging experiments of Chargaff previously mentioned (58). Mellanby (198) and Dale and Walpole (68), using chick plasma, came to the conclusion that an inactive form of thrombokinase was present in plasma and serum. Mellanby liberated this substance by means of alkali, while Dale and Walpole suggested that trypsin and chloroform acted through an activation of this substance.

According to Lenggenger (182,183), prothrombokinase (in his terminology, "prothrombokinin") can be separated from human citrated plasma by dilution and acidification. He completely removed the platelets by centrifugation before precipitation, but his precipitate is an active substance resembling the platelet-containing substances of Bordet and Delange. The precipitation from citrate plasma or serum of an active globulin of thromboplastic nature was confirmed by Widenbauer and Reichel (313). Increased CO₂ pressure inhibits the action of this plasma thrombokinase (Widenbauer, 311) and also that of thrombokinase from tissues. When human citrated or oxalated plasma is diluted 1:1 with distilled water, and CO₂ is bubbled through, the clotting time after recalcification progressively decreases as the treatment is prolonged. The clotting time may be as low as 19 seconds after treatment for about 30 min-

utes, but it then slowly rises again. This experiment indicates that the prothrombokinase present in the citrated plasma is converted into thrombokinase without the interaction of calcium. This is an important observation which needs confirmation (Reichel, 262). It should be pointed out that the successful separation of thromboplastic substances from plasma or serum seems to depend on the degree of dilution, because increasing the dilution will cause precipitation of the prothrombin also (the method of Mellanby). After redissolving such a precipitate and after the addition of Ca^{++} a potent solution of thrombin may be obtained (76,182); and in this manner the clotting globulin prepared by Parfentjev (237) from rabbit plasma is evidently changed into thrombin (35). This applies to mammalian plasma. However a similar precipitate from chick plasma (6,198) is very stable even in the presence of calcium ions, indicating that the prothrombokinase present in avian plasma is not activated under these conditions. It may be mentioned here that avian plasma does not contain platelets.

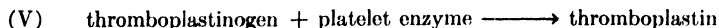
Feissly (90) also adheres to the theory of the presence of an inactive thrombokinase in plasma, and his experiments indicate that this substance is decreased in hemophilia, although an inhibitor may also be involved. Laki (174) isolated a substance from plasma (plasmakinin) which could be converted into an active thrombokinase. He found that the autocatalytic reaction was decreased in hemophilic blood and could be restored by addition of "plasmakinin." He assumes his substance to be identical with Lenggenhager's and Widenbauer and Reichel's prothrombokinase. This is an interesting observation, as the new accelerator factor (factor 5) is known to be present in hemophilic plasma (see later). These results point definitely to the presence of a latent thrombokinase as well as an accelerating factor in normal blood plasma.

In 1935, Quick, Stanley-Brown, and Bancroft (254) had shown, using the one-stage method for prothrombin determination, that the amount of prothrombin is normal in hemophilic plasma, thus giving evidence that a deficiency of thromboplastin occurred. Evidence of this in certain hemorrhagic diseases was also found by Carpenter and Allen (49). It was emphasized by Brinkhous (45) that the defect of hemophilic plasma lies in the factors concerned in the formation of thrombin. Using the two-stage technique he found that prothrombin is very slowly converted into thrombin in hemophilia, but it reacted

promptly on the addition of a thromboplastic agent. This idea of a decreased prothrombin conversion rate in hemophilia was further developed by Quick (250), who found that, after spontaneous clotting of hemophilic blood, the serum contains almost the total amount of prothrombin, while normal blood serum contains only 15–20%. He has proposed a method for measuring the consumption of prothrombin as a test for hemophilia. The basis of this interesting and—apparently—reliable test is that the prothrombin time measured with the one-stage method is normal, thus excluding a deficiency in prothrombin and in factor 5 (Owren). Quick's results imply beyond doubt that a plasma thromboplastin as well as the new factor (factor 5, accelerator factor, labile factor) participates in the clotting of normal plasma.

The extreme importance of this question is accentuated by the investigations of Milstone (205) in which he makes a three-stage analysis of blood coagulation. The first step is a transformation of the prothrombokinase present in plasma into thrombokinase in the presence of Ca^{++} . In this connection it must be remembered that Reichel (262) was able to produce an active thromboplastic agent by simple dilution and acidification of citrated oxalated plasma, indicating that the conversion of prothrombokinase into thrombokinase may occur without the interaction of calcium ions. Milstone, however, is of the opinion that his "prothrombokinase" is identical with the new accelerator factor (labile factor, factor 5). His methods of preparing this compound and of removing it from the solutions of prothrombin (by standing for some days in the refrigerator in the presence of oxalate) indicate that the substance in question is the accelerator factor and not a thromboplastinogen. The substance seems to accelerate the formation of itself and may be formed by an autocatalytic reaction. Milstone's results will be discussed further in a following section, but it may be remarked at this point that his "thrombokinase" appears not to be identical with the substance which is generally given this name or termed thromboplastin.

Quick (250) further suggests that the platelets under the influence of thrombin release an agent acting on the thromboplastinogen and converting it into thromboplastin according to equation (V):



In the sequence of blood clotting, the autocatalytic behavior could

therefore be explained through a series of reactions in which the end-product, thrombin, acts on the platelets and thus induces new starting reactions. This proposal appears rather complicated and ignores the recorded experiments on the autocatalytic clotting of platelet-free chick plasma.

In a later investigation on plasma thromboplastinogen, Quick and Stefanini (256) presented evidence for a factor which inhibits the activation of thromboplastinogen. Tocantins (296) described an antithromboplastic agent which is increased in hemophilic blood. Also, Lozner, Johnson, and Taylor (188) describe the presence of an anticoagulant which is not heparin. Schneider (271) finds an inhibitor of his placental thromboplastic in serum—see Fulton and Page (118). On the other hand, it may be recalled that Mellanby (198) found no antikinase in chick plasma and that Lenggenhager (182) and Reichel (261) were able to keep thromboplastin in oxalate or citrate plasma for 24 hours without deterioration. Calcium ions were found by Erickson and Ferguson (82) to produce a thromboplastic solution from washed platelets from citrate plasma. Concerning the thromboplastic activity of proteases, Ferguson (98,101), advocates that a proteolytic enzyme in plasma activates prothrombin in a manner similar to trypsin, and that it plays a role in the normal process of blood clotting. His arguments lose some of their strength after it has been shown that trypsin and the proteolytic plasma enzyme (fibrinolysin, plasmin) represent quite different types of enzymes; but his observation (98) that calcium ions greatly accelerate the clotting action of trypsin, although crystalline trypsin is able to clot citrated plasma, is of considerable interest and may be compared with the effect of calcium on the autocatalytic conversion of trypsinogen into trypsin (189).

In a comprehensive paper Fredericq (114) has studied the clotting of plasma in the absence of calcium by means of bacterial metabolic enzymes and found that some of these (especially from staphylococci) act directly on fibrinogen, while others (especially from *Bact. pyocyaneus*) activated prothrombin into thrombin without the participation of calcium ions. Some of the products investigated produce fibrinolysis. He compared the action of these bacterial enzymes with the action of trypsin, papain, certain snake venoms, and chloroform. The first action of chloroform is to destroy the serum antithrombin. This reaction releases thrombin and explains the coagulation of oxa-

lated plasma. Second, the prothrombin in the presence of Ca^{++} is converted into thrombin, thus yielding a stable solution of thrombin. Concerning this reaction Fredericq advocates a view similar to Ferguson's, *viz.*, that the proteolytic enzyme released by chloroform in plasma (plasma tryptase) is the physiological activator of the precursor of thrombin (prothrombin = serozyme*). He assumes his plasma tryptase to be identical with the "thrombozyme" of Nolf. On the other hand, the precursor of prothrombin (proserozyme*) is converted into prothrombin (serozyme) by means of chloroform even in the absence of calcium, a result reminiscent of the activating experiments of Reichel (262) mentioned above. It may be added that the relation between Bordet's "proserozyme" and a plasmatic thromboplastinogen or the precursor of the accelerator factor (factor 5) has not been settled.

Nolf has presented his views (221) and in a number of papers has especially studied the coagulant action of chloroform (220). In regard to hemophilic blood (224) he arrives at the conclusion that one of the factors essential to the activation of prothrombin is lacking. He discusses especially the properties of thrombokinase as a physiological or chemical entity (222). An evaluation of his results in the light of modern conceptions and in terms of generally accepted theories is difficult, and a careful reconsideration of his experimental details is needed. His very broad investigations during more than forty years contain observations (especially on questions of more physiological nature) which can be used as an inspiring source for further developments.

C. THE ROLE OF CALCIUM

The role of calcium in blood clotting was comprehensively reviewed by Ferguson (95). Nordbö (227) made a comprehensive study of the activity coefficients of calcium and oxalate ions in plasma and of the importance of the concentration of the calcium ions for the clotting of blood. He finds that a certain minimal concentration of calcium ions is necessary in order to induce clotting, but that, because of the decrease in the activity coefficients, this minimal concentration depends upon the presence of other components in plasma. The minimum amount in plasma containing strong electrolytes in a concentration of 0.16 mole/kg. H_2O in plasma is between 0.15–0.18

* See also Section IIG.

millimole $\text{Ca}^{++}/\text{kg. H}_2\text{O}$, but this amount corresponds to a calcium ion activity of only 0.04–0.05 millimole/kg. H_2O . The slow precipitation of calcium oxalate in plasma explains why an excess of oxalate is necessary to prevent clotting under normal conditions. Neutral salts act by decreasing the activity coefficient of the calcium ions. Nordbö draws attention to an important point—that the dependence of coagulation on a minimal concentration (activity) of calcium ions does not exclude the possibility that calcium participates in the clotting process in nonionized form combined with a protein, because the amount of this compound will be very small, and the bound calcium will be in equilibrium with the ionized calcium. Lebel, Schönheyder, and Muus (178) made a similar confirmative investigation on the action of citrate; see also Ransmeier and McLean (259). The binding of Ca^{++} to proteins has been reviewed by Greenberg (131) and the binding especially to plasma proteins has been treated by Chanutin, Ludewig, and Masket (51) and Klotz (170).

Experiments by Ferguson (96) suggest that an intermediate compound containing calcium is formed during the conversion of prothrombin into thrombin, and that this compound is slowly converted into "ripe" thrombin which contains no calcium. In a series of papers Quick and Stefanini (244,251,255) have studied the calcium question. They arrive at the conclusion that a calcium compound containing nonionized calcium is essential to coagulation. They also explain the slow precipitation of calcium upon addition of oxalate as a slow removal of calcium from this compound and not as a retarded precipitation of calcium oxalate, as did Nordbö. This explanation appears more natural than the assumption of a supersaturated calcium oxalate solution. On the other hand, the concepts of Nordbö about an equilibrium between the ionized calcium and calcium bound in an active complex with proteins are still valid and there need not be a discrepancy between his (and others) results and those of Quick, for even if the component functioning in coagulation contains calcium in combined form this will continue to be in equilibrium (because of dissociation) with a certain concentration of free calcium ions. The amount of the active component present during clotting would probably be so small that an analytical determination of its amount in terms of calcium content is impossible, and the amount of nonionized calcium found normally in plasma is evidently due to entirely different compounds which play no role in blood clotting.

Quick and Stefanini (255) found that citrate differs in its action from oxalate. It seems that the main function of citrate is to depress the activity of prothrombin rather than to remove calcium from an active complex. Thus prothrombin, which is easily absorbed on tricalcium phosphate from oxalated plasma, is not absorbed when citrated plasma is similarly treated. This is a very important observation, which needs immediate confirmation, since discrepancies between the results of previous authors might be due to differences in experimental conditions. Quick and Stefanini especially pointed out that the investigations of Lenggenhager and Milstone were carried out with citrated plasma. Also, the activating experiments of Reichel (262) mentioned several times might be reconsidered in the light of these observations. In their investigations, Quick and Stefanini used two new techniques recently introduced; a decalcification by means of Amberlite, and the use of silicone-treated glassware.

D. NEW TECHNIQUES

Ion-exchanging resins as decalcifying agents were introduced by Steinberg (289). He used the resin Amberlite IR-100 (commonly used for preparing deionized water). The method was further developed by Quick (251) and Stefanini (288) and appears to be a very convenient tool for work on blood problems when a purified resin is used. Stefanini removes calcium from the thromboplastin to be used in these experiments by trituration of the brain tissue with sodium oxalate before acetone dehydration. In recent years, the most commonly used decalcifying anticoagulant for commercial use in Europe has been mixtures of pyrophosphates, but metaphosphates or poly-metaphosphates may also be used (120). Metaphosphate was mentioned by Morawitz (209), and Larson (176) has described the use of sodium hexametaphosphate. These substances appear to yield easily a yellow plasma without any red tinge.

The silicone technique was introduced by Jaques, Fidlar, Feldsted, and Macdonald (157) in an effort to replace the paraffin coating of glass tubes previously used for retarding the spontaneous clotting of blood. They found that some commercial resins, the silicones, derived from organic silicon compounds, and having water-repellent properties, delayed the clotting of blood. They covered all glassware with a silicone film by treatment with a liquid methylchlorosilane (General Electric Dri-Film No. 9987) followed by a thorough rinsing in water.

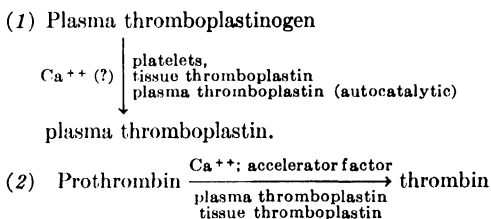
The silicone-coated tubes were considerably more effective in delaying the spontaneous blood coagulation than paraffin-coated tubes. With this method it is possible to obtain a fairly stable mammalian plasma without the addition of or treatment with anticoagulants. The platelets agglutinate and disintegrate very slowly in blood kept in silicone-treated beakers. Jaques and his co-workers found that plasma obtained with the silicone technique clotted in normal glass tubes in accordance with its content of platelets. However, no such correlation was found when coagulation took place in silicone-coated tubes. They suggest that plasma may contain a soluble thromboplastic agent.

Patton, Ware, and Seegers (238) confirmed these results on delayed clotting. They attempted to remove the platelets and any soluble thromboplastic agent by high-speed centrifugation (23,000 r.p.m.) by which they hoped (see experiments of Chargaff) to prevent coagulation. They did not always succeed in obtaining a spontaneously incoagulable plasma and concluded that their experiments did not support the theory proposing a soluble factor in plasma which can initiate clotting independent of platelet action. In view of their rather restricted experiments, this conclusion seems premature. A combination of the silicone technique and high-speed centrifugation should be able to solve the question of a soluble thromboplastinogen present in plasma and its possible autocatalytic conversion into active thromboplastin.

An investigation aimed at the clarification of this question was made by Brinkhous (46). He also used the silicone technique and confirmed the results of the Canadian investigations. Brinkhous resumed his experiments on the delayed conversion of prothrombin into thrombin in hemophilic blood (45). He prepared citrated normal plasma and obtained, after prolonged centrifugation, samples which did not clot after recalcification in ordinary glassware at 28°C. The prothrombin conversion rates of these samples were delayed in accordance with the increased clotting times. Addition of suspensions of normal platelets decreased the clotting times to normal values of 6 to 9 minutes. Clotting times in hemophilic *blood* were also brought to normal values when the samples of normal plasma were added, but the effect on hemophilic platelet-free *plasma* decreased with prolonged centrifugation of the added normal samples. Platelet-rich hemophilic plasma behaved as whole hemophilic blood. The

platelet suspensions alone, however, did not correct the clotting defect of platelet-free hemophilic plasma. Brinkhous draws the conclusion that clotting of normal plasma depends upon the presence of formed elements (platelets) together with an unknown factor present in dissolved state in normal plasma but absent from hemophilic plasma. He assumes that this factor acts on the platelets, liberating thromboplastin, and he explains in this manner the beneficial effects of blood or plasma transfusions in hemophiliacs. He supposes that the thromboplastic protein present in plasma (Chargaff) was not removed in his centrifugation experiments. Brinkhous's experiments evidently have yielded very clear-cut results, and comprise an important contribution. It does not seem necessary to assume that the unknown plasma factor is a platelet-destroying substance. Assuming that the platelets acted on a plasma thromboplastinogen and converted it into thromboplastin would yield an equally acceptable explanation and would bring the results of Brinkhous into line with and extend those of other investigators (*cf.* 205a).

Should one dare tentatively to formulate a scheme for the reactions leading to the formation of thrombin in plasma, perhaps the following sequence would be the most probable:



The recent availability of strains of hemophilic pigs and dogs as experimental animals in conjunction with the new techniques using silicone and high-speed centrifugation will serve as a basis for new experiments designed to explain the mechanism of the activating process in blood clotting and the defect in hemophilia (126a).

E. DETERMINATION OF PROTHROMBIN

An overwhelming amount of new observations have accumulated during the most recent years concerning prothrombin and its conversion into thrombin as a result of the widespread use of blood transfusions and dicoumarol medication. Deviations from what was

expected were observed on several occasions. This led to the formulation by Quick (246) of prothrombin in its classical sense as being composed of two components, and to the discovery by Owren (232) of a clinical condition in which a new factor essential to the conversion of prothrombin into thrombin by means of thromboplastin was absent from the blood.

Fundamental for the investigation of prothrombin is the determination of prothrombin concentrations. The one-stage method of Quick and the two-stage method of H. P. Smith and collaborators are the two procedures commonly employed. The first method is the most convenient and is therefore most widely used for clinical purposes. The second method is a theoretically more sound method and is used whenever more complete information is needed. It is felt that the scope of this paper does not include a thorough treatment of recent discussions on the determination of prothrombin.

For this the reader is referred to the Transactions of the First Josiah Macy, Jr., Foundation Conference on Blood Clotting and Allied Problems (38), which give a lively picture of the subject together with a number of instructions for the determinations as carried out at some of the more important institutions. Only a few points of especial interest to the enzymological side of the question will be mentioned.

The drawback of the one-stage method lies in the fact that coagulation is measured in a mixture which contains simultaneously prothrombin undergoing conversion into thrombin and fibrinogen being transformed into fibrin under the influence of the thrombin formed. At the time of clotting only a fraction of the prothrombin will appear as converted into thrombin, and the clotting time is therefore only indirectly an expression of the concentration of prothrombin in the mixture. If the velocity with which prothrombin is converted into thrombin is influenced by variable factors other than the concentration of prothrombin, erroneous results will be obtained if the clotting data are recorded as prothrombin concentrations. The sensitivity of the method can be increased by dilution, thereby increasing the clotting times and consequently the reaction time. Such a derived method was used by Link and his collaborators in their isolation of dicoumarol (48) (they mention here the straight lines obtained in double logarithmic graphs). The sensitivity can be increased still further when fibrinogen or prothrombin-free plasma is added to keep the amount of fibrinogen constant; using such a procedure, Thordar-

son (294) observed the hyperprothrombinemia occurring during pregnancy. The influence of the fibrinogen levels on this modified method has been studied especially by Deutsch and Gerarde (73). As mentioned in the preceding section, the relation between "prothrombin time" and the concentration on prothrombin appears as a hyperbolic curve yielding a straight line on the double logarithmic graph, and this relation was thoroughly treated by Legler (179). Rapoport (260), evidently unaware of Legler's paper as well as the results of several other investigators, presents a modified Quick formula for the relation between "prothrombin time" and prothrombin concentration.

In the two-stage method the prothrombin is completely converted into thrombin before its determination; this method is therefore essentially a method for the determination of thrombin. The relation between clotting time and the concentration of thrombin may yield direct reciprocity, but very often, especially when working with plasma as a source of fibrinogen, deviations are encountered. The results adhere, however, completely to the double logarithmic relationship mentioned—see the papers of Jaques (152), Legler (179), and Astrup (9). The sensitivity of the two-stage method may also be increased by dilution. In this manner the influence of antithrombin is greatly retarded—Herbert (137), Rieben (263).

Complications might be encountered when adding fibrinogen-containing reagents. This applies especially to the one-stage modifications in which foreign prothrombin-free plasma is used as a fibrinogen-containing diluent. Such plasma contains the accelerator factor (factor 5). The addition of such solutions may therefore produce normal clotting times in the one-stage method, even in cases in which this factor is lacking. The use of this modification in clinical routine work is therefore not recommended.

Thromboplastic snake venom has been recommended by some authors as a substitute for the more or less insoluble mammalian thromboplastic agents commonly used (117,235). Results obtained by means of this agent should, however, be regarded with caution, and cannot be compared directly with results obtained by generally accepted methods, as it has been found that a considerable difference exists in the mode of action of the two classes of substances. Thus lecithin plays an important role in the action of the snake venoms (33,77,177,191,247) and it has been noted (317) that, after the inges-

tion of dicoumarol, considerably higher prothrombin concentrations are observed in the blood when venom is used as a thromboplastic agent (34,89,318).

A review on vitamin K or dicoumarol is outside the scope of this paper, as both substances act only *in vivo*. References may be found in the papers of Dam (69) and Link (185). Salts of the rare earths also decrease the concentration of prothrombin *in vivo* (74,133,298).

The activation of prothrombin is still a problem of dispute (see Section D). Prothrombin and thromboplastin, and possibly also calcium, appear to interact according to a stoichiometric relationship in the formation of thrombin, but the nature of this reaction is unknown, although some experimental facts point to a splitting of the prothrombin molecule into smaller thrombin molecules. Mertz, Seegers, and Smith (201) detected in careful experiments a quantitative interrelationship between prothrombin and thromboplastin. They could titrate thromboplastin when using solutions containing an excess of prothrombin. Until quite recently Seegers considered a stoichiometric reaction between thromboplastin and prothrombin (274), but he seems now to be of the opinion that thromboplastin is not consumed during thrombin formation (275,301). Chargaff (55) found it possible, by high-speed centrifugation, to isolate the thromboplastic agent with unchanged activity after it had reacted with prothrombin, and he adheres to the theory of an enzymic reaction. According to Owren (233, p. 192) the stoichiometric results obtained by Smith *et al.* (201) may be explained through interference with the new accelerator factor. Quick (251) used Amberlite-treated blood in an investigation on the quantitative relationship between calcium and prothrombin. Loomis and Seegers (186) measured the *pH* optimum of the activation (*pH* 7.2) and the inhibitory influence of salts on the activation. They conclude that calcium acts as a catalyst.

F. PROTHROMBIN AND THROMBIN

For a complete understanding of the activation process purified preparations of prothrombin and thrombin are needed. Seegers *et al.* have developed further their methods based on the adsorption of prothrombin on magnesium hydroxide (277,278,283,307). Fantl and Nance (86) investigated the adsorption of prothrombin on tertiary calcium phosphate, magnesium hydroxide, alumina gel, barium carbonate, and barium sulfate. The latter two substances were found to be

the most selective adsorbents and were used for preparing prothrombin (88). Fantl and Nance suggest an adsorption technique as a chemical determination of prothrombin, but the results of Rosenfield and Tuft (268) show an increased protein adsorption on barium sulfate in blood when the prothrombin content is decreased as a result of liver disease and dicoumarol therapy. The method is not recommended for clinical use. Munro and Munro (213) describe the preparation of prothrombin by adsorption from plasma directly on alumina gel.

The principles of Mellanby (199) have served as a basis for further developments by Milstone (204) and Robbins (265). In this method, prothrombin is spontaneously transformed into thrombin during storage of the purified prothrombin. Seegers *et al.* (*loc. cit.*) add thromboplastin to the purified prothrombin in order to convert it into thrombin. Astrup and Darling (11,12) resume the older method of Mellanby (198) and Bleibtreu (37) and describe a convenient method of obtaining thrombin preparations by adding thromboplastin to the solution of Mellanby fibrinogen. They tried to prepare prothrombin in a similar manner (19) but obtained unstable solutions because of the presence in the preparations of proteolytic enzymes which could not be removed. The destruction of prothrombin by the proteolytic enzyme in plasma was later observed by Seegers and Loomis (274, 279). Thrombin is not destroyed under these conditions (123,279), although it is destroyed by trypsin (124,125). Astrup and Darling (11,12,17,19) found thrombin to behave as an albumin, while prothrombin appears to behave as a globulin. Similar results were obtained recently by Seegers and Ware (285). Thrombin does not contain phosphorus. It cannot therefore contain the thromboplastic lipide as an integrated part of the molecule. The conversion of prothrombin may therefore consist in a splitting of a globulin molecule into one or more smaller albumin molecules of thrombin. This is evidently a specific proteolytic process, the nature of which is still unknown. A stoichiometric reaction of thromboplastin (and calcium ?) in this process would indicate that part of the prothrombin molecule is split off in combination with these substances, leaving the thrombin molecule behind. This reaction appears to be one of selectivity in that thromboplastin (and Ca) are unable to activate a number of other zymogens. The activating properties of some proteolytic enzymes (*e.g.*, trypsin) may be explained as a nonspecific proteolytic

splitting of the prothrombin molecule into smaller fragments, part of which will pass through an intermediary state corresponding to the configuration of thrombin. In such a dynamic reaction molecules and split-products of various sizes are simultaneously broken down further. The amount of thrombin will be small compared with the total amount obtainable in the specific process and it will disappear during the reaction. This mode of reaction is therefore tentatively suggested as an explanation that will bring the proteolytic activation of thrombin into conformity with the known properties of the substances and with the activation by means of thromboplastin.

Prothrombin was prepared in large quantities from human blood for the production of thrombin by the low-temperature-ethanol precipitation method developed especially in E. J. Cohn's laboratory. An excellent review was given by Edsall (78) (see also 62,80,228). A similar method based on precipitation with ether in the cold was worked out by Kekwick *et al.* (168).

The inactivation of prothrombin by the proteolytic enzyme in plasma (plasmin, fibrinolysin) has been mentioned. Mertz, Seegers, and Smith (200,201) obtained evidence that prothrombin was inactivated by thrombin. According to Ferguson (97) prothrombin, however, is stable in the presence of thrombin; and he suggests that the proteolytic plasma enzyme is responsible for the destruction of the prothrombin reported by the previous authors. The prothrombin prepared from chick plasma after the method of Mellanby is stable and is not destroyed when chicken thrombin is added (Astrup, 6). It is difficult to prepare thrombin solutions without traces of proteolytic enzymes (*cf.* the paper of Hudemann, 146), or proenzyme (Astrup and Permin, 23). Astrup and Darling (19) supposed that the proteolytic enzymes present as impurities were the cause of the destruction of prothrombin as observed by Mertz *et al.* Prothrombin might be very sensitive toward this enzyme and therefore react after the addition of only small amounts. Collingwood and MacMahon (63) seem to be the first to have observed a deterioration of prothrombin under these conditions. Seegers, however, still is of the opinion that pure thrombin as such destroys prothrombin (274,275,307), although the results of Owren (233) support the opinion of Ferguson and Astrup. Seegers (273,302) studied the stability of prothrombin and thrombin. Glycerol (75%) and sucrose (66%) are among the best stabilizers for thrombin solutions, while prothrombin is not

stabilized. Fantl and Nance (87) investigated the inhibitory action of some SH-containing substances (cysteine, glutathione and 2,3-dimercaptopropanol (BAL)) on the components of the clotting system. BAL was found to be the most active inhibitor. It had no effect on thromboplastin or fibrinogen and only a slight effect on thrombin; but it rapidly inactivated prothrombin. Seegers and Doub (276) investigated the action of oxidized cellulose (used as a hemostatic substance) on thrombin. The acidic products destroyed thrombin because thrombin is inactivated at acidities higher than pH 4.3. When neutralized, only highly oxidized cellulose will destroy thrombin, but the nature of the inactivating factor is not known (see 66). Pálos (236) found thrombin to be destroyed by molecular oxygen, a reaction which could be prevented by heparin. Astrup (10) investigated the action of tetranitromethane (TNM) and found fibrinogen to be rather stable, while thrombin in the presence of TNM was inactivated rapidly in a first-order reaction with an activation energy (E) of about 15,000 calories. Thrombin is adsorbed on the fibrin formed during clotting, but is released again after resolution by means of the proteolytic plasma enzyme (Seegers, 274; *cf.* 210 and 321). The method of Howell (143) for preparing thrombin was based on an extraction of thrombin from the fibrin (*cf.* 266).

In some instances a regeneration of the activity of inactivated prothrombin has been claimed (139). Chak and Giri (50) found that CO_2 would regenerate prothrombin (*cf.* 295), and Munro and Munro (212) describe a factor responsible for its reactivation. Seegers (275, 307) describes a regeneration of prothrombin during its destruction by means of thrombin. These processes are still obscure and need further investigation before the interference of side reactions is excluded.

G. FACTOR 5 OR THE ACCELERATOR FACTOR

A question of major importance is the stability of prothrombin in blood and plasma as used for blood transfusions. A wealth of papers have appeared concerning this question, but they need not be reviewed here, as the discrepancies between the results of various investigators appear to find an explanation in the existence of two plasma proteins being responsible for the formation of thrombin, one of these being the prothrombin proper, and the other a labile protein

termed by various discoverers as *prothrombin-A*, *labile factor*, *factor 5*, *accelerator factor*, or *accelerator globulin*. References on the stability of prothrombin in plasma are found, for example, in the papers of Kazal and Arnow (164), Ware, Guest, and Seegers (302), and Fantl and Nance (88).

In 1943, Quick (246,249) made the important observation that oxalated plasma that had lost its prothrombin content during storage regained its ability to clot when mixed with plasma from an animal receiving dicoumarol and which alone would not clot. Quick drew the conclusion that the classical prothrombin consists of two components coupled by means of calcium. He called the labile component which disappears during storage *prothrombin-A* and the more stable component, which disappears in dicoumarol poisoning, *prothrombin-B*. It is the latter component that is removed by adsorption, e.g., on alumina. Heating destroys the labile component very rapidly. It is stable in native plasma, but unstable after addition of decalcifying agents (oxalate, citrate). Deficiency in vitamin K reduces the amount of the stable component. Quick later (253) changed the term "component A" to *labile factor*, now considering "component B" to be the prothrombin proper.

In 1944, Owren (232) described a case in which the prothrombin time as measured by Quick's method was prolonged, but which did not respond to a treatment with vitamin K. Such patients had been observed by previous authors, but Owren, using blood from his patient, was able to show that the amount of prothrombin in the blood was normal and that a new factor (called "factor 5" or "V") essential to the transformation of prothrombin into thrombin was lacking in his patient. The experiments leading to these results were later published as a comprehensive study (233). A normal prothrombin time was obtained when small amounts of normal mammalian (including human) plasma were added, even after prothrombin had been removed from these samples by adsorption on alumina. Owren later purified this new factor (234). He further showed that, in order to be able to transform prothrombin into thrombin (in the presence of thromboplastin and Ca^{++}), factor 5 must be converted into a new component, "factor 6" or ("VI"), which is the active substance proper and of which factor 5 serves as a proenzyme. Factor 6 is easily destroyed and disappears, therefore, during and after the reaction. Fischer's double logarithmic formula for the action of thrombokinase

is valid also for the action of factor 5. In hemophilic blood the concentration of factor 5 is normal. During storage of blood, factor 5 disappears. From his very careful investigations Owren drew the following conclusions about the mechanism of the formation of thrombin.

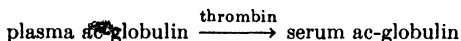
Factor 5 in the presence of thromboplastin and Ca^{++} and a component present in the prothrombin preparation, but which presumably is not the prothrombin proper, is converted into factor 6. This new factor then transforms prothrombin (in the presence of Ca^{++}) into thrombin. In the first reaction, thromboplastin may be exchanged with factor 6, and this explains the autocatalytic formation of thrombin. Quite recently Owren (36) has presented evidence that even the transformation of prothrombin into thrombin by means of factor 6 needs the presence of an additional new factor. According to Owren prothrombin does not disappear rapidly from serum, as found by Quick in his previously mentioned "prothrombin consumption test." The basis for this test is a disappearance of the new factor essential for the formation of thrombin in the presence of factor 6. This observation is of great importance and may be the clue to some of the controversies about the properties of factor 5 and factor 6.

In 1945, Nolf (223) showed, by means of a treatment with tricalcium phosphate, that the classical prothrombin in native plasma consisted of two substances which could be separated from each other. The properties of one of these substances (226) indicate a probable relation to Owren's new factor just mentioned.

In 1946, Fantl and Nance (85) presented evidence that a factor accelerating the conversion of prothrombin into thrombin was present in plasma. They regard this factor as identical with Owren's factor 5 and with Quick's labile factor and described its preparation and properties in later papers (88).

Seegers and collaborators soon confirmed the findings of Fantl and Nance of a factor in plasma accelerating the activation of prothrombin (304). They further confirm Owren's results on the difference between the accelerator factor as present in plasma and as present in serum, although they assume the transformation of the plasma factor to the active serum factor to be caused by thrombin (305). In a number of papers Seegers *et al.* investigated the properties of the accelerator factor and found it rather stable in oxalated ox plasma (214). Bovine plasma contains large amounts of the accelerator

globulin, while the amount in human plasma is rather low (214,233). In chloroform poisoning, the concentration of accelerator globulin as well as of prothrombin decreases (291). They described the partial purification and determination of plasma and serum accelerator globulin (306). They regard the plasma ac-globulin as identical with Owren's factor 5 and serum ac-globulin as corresponding to his factor 6, but find that Ca^{++} is not necessary for the formation of the active accelerator for which they propose the following equation (*cf.* 275):



Although Seegers is of the opinion (214,278,304,306) that his ac-globulin is different from Quick's prothrombin-A or labile factor, Owren as well as Fantl and Nance assume their factors to be identical with both these components (88,234).

Further work in Quick's laboratory (142,255) confirmed his previous experiments and proved that fibrinogen was not the cause of the retarded prothrombin time obtained in stored or adsorbed plasma, but that a labile factor was involved. It was found that, while this factor disappears rapidly in oxalated plasma during storage, it is fairly stable in citrated plasma, an observation that may explain some of the discrepancies noted.

The proof of the existence of this new fifth factor in blood coagulation and the finding of a clinical condition in which it is lacking forms the explanation of a number of observations made by previous authors.

In their work on prothrombin and its purification Smith *et al.* (272,308) noted a delayed velocity of its conversion into thrombin as more pure products were obtained, and this observation has been confirmed by all subsequent workers. They also observed that prothrombin in certain species (man, guinea pig) was converted more slowly into thrombin than in other species (dog, rabbit), a fact which interferes with the determination of prothrombin in the one-stage method. Heating prothrombin produced slow convertibility (Mellanby, 199; Seegers, 272,306). Astrup (6) made the observation during his investigations on autocatalysis that the velocity of thrombin formation appeared to depend upon the presence of a variable factor in the solutions of Mellanby fibrinogen.

Brambel and Loker (44) found evidence for prothrombin acceler-

ators or activators in blood. The independent clotting-accelerating properties of serum were observed as early as in 1904 by Bordet and Gengou (42,43). Bordet assumes that a precursor ("proserozyme") of prothrombin ("serozyme") exists in blood, and that proserozyme rather than serozyme is adsorbed on tricalcium phosphate (40). Wiemer (314) finds that tricalcium phosphate adsorbs prothrombin proper. Zunz (328) describes a conversion of proserozyme into serozyme by means of staphylocoagulase, thus confirming observations of Gratia (128)—compare the results of Fredericq (114).

All these results are now easily explained as being due to variation in the amount of the accelerator factor present.

Since the discovery of the new factor in blood clotting, experiments confirming and extending these results have appeared steadily (91, 100, 104, 149, 195, 196, 212, 213, 229, 258). In his first paper, Quick used dicoumarol plasma in some of his experiments. Later results indicate that the relations may be more complicated than he had assumed. He now believes that the stable prothrombin compound consists of two factors (252). MacMillan (194), Owen and Bollman (230), and Conley and Morse (64) obtained irregular dilution curves in mixtures of dicoumarol plasma and adsorbed plasma. Dam (70) obtained similar results with mixtures of plasma from vitamin-K-deficient and dicoumarol-poisoned chicks. The amount of the accelerator factor in blood did not decrease significantly during dicoumarol treatment (83). Mawson (197) finds evidence for accelerator factors other than factor 5 in experiments with brain thromboplastin and mixtures of snake venoms and lecithin on dicoumarol plasma and plasma from a case of nontropical sprue. The action of viper venom on the accelerator factor differs from that of thromboplastin (84).

The discovery of the new fifth factor is without doubt the most important contribution to the *chemistry* of blood clotting since the classical theory was accepted generally as a working basis a decade ago. The equally important discoveries of vitamin K and dicoumarol are associated primarily with the *physiology* of blood clotting. The problems of most significance for further development are without question the elucidation of the properties of this new factor 5, its transformation into factor 6, and the mechanism of its action in the clotting process. On these points opinions are divergent. Of importance is the disclosure of any possible relationship to thromboplastinogen in plasma, to an eventual precursor ("proserozyme") of pro-

thrombin, or to the proteolytic ("tryptic") enzyme in blood. Some of these questions have been discussed by Owren in his monograph, but the problems are still unsettled. The appearance of the papers of Milstone (205) further indicates the need for clarification. He describes experiments intended for the investigation of the plasmatic prothrombokinase but obtains, as it seems, results conforming to those obtained for the accelerator factor. In fact, Milstone assumes the thromboplastinogen (prothrombokinase) of plasma and the fifth factor to be identical. As previously mentioned, it appears beyond doubt that the thromboplastinogen of plasma and factor 5 are separate entities. They have different properties, and while the thromboplastinogen is decreased in hemophilic blood the amount of factor 5 is normal. A careful reinvestigation of all previous experiments relating to the plasmatic thromboplastinogen and its conversion into thromboplastin in the light of our new knowledge about the fifth factor is therefore urgently needed. Much unavoidable confusion exists because this factor and its role in the clotting process were unknown to earlier investigators. Most probably the formation of an active thromboplastic agent in plasma from the thromboplastinogen plays a role in the conversion of factor 5 to factor 6, thus explaining a seemingly autocatalytic formation of this factor and of thrombin.

It seems evident now that the factors known as prothrombin-A, labile factor, factor 5, accelerator factor, and ac-globulin are the same substance. None of the terms mentioned are suitable as a systematic name for the substance in question. To avoid confusion the present author, not being involved in this part of the blood-clotting field, may be excused for taking the opportunity to propose *accelerin* as a name for the new active clotting factor. This term permits an easy formulation of *proaccelerin* for the precursor and follows the terminology used for other substances produced from proteins circulating in the blood such as thrombin, plasmin (fibrinolysin), hypertensin, and fibrin. Owren (233) has proposed the terms *prothrombinase* (or thrombinogenase) and *pro-prothrombinase* (or prothrombinogenase) for factor 6 and factor 5, respectively, but admits the poor adaptability of these terms. Further it is perhaps an advantage that the proposed term does not involve any assumptions concerning the mode of action of the substance on prothrombin, but only expresses what is observed, namely, an acceleration of the thrombin formation.

III. The Clotting Process

A. FIBRINOGEN

Fibrinogen is the substrate on which thrombin acts. This reaction is a conversion of a soluble protein present in colloidal solution into an insoluble protein (fibrin) appearing under normal circumstances as a solid clot. That means that the reaction consists in a sol-gel transformation, but the mechanism is still unknown although it is now universally accepted as an enzymic reaction.

Fibrinogen is generally prepared from plasma by means of a salt precipitation (NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). It is a very labile protein, and almost every investigator has made his own modifications of the procedures involved. Astrup and Darling (15) compared different methods and found that ammonium sulfate yielded the best results—*cf.* Wunderly (326,327). Nanninga (216,217) used a similar method but preferred barium sulfate as adsorbent instead of tricalcium phosphate. His fibrinogen preparations appear remarkably stable. Jaques (154) preferred precipitation with concentrated phosphate solution in order to eliminate nitrogen, and also obtained stable solutions. Avery and Munro (25) obtained the highest purity by phosphate precipitation. The isolation of fibrinogen by Cohn's alcohol precipitation method is described by Edsall (78,80,211) and Cohn *et al.* (62). A globulin less soluble in plasma than fibrinogen is found. It separates in the cold and presents difficulties during electrophoresis (211).

This observation has been made by several previous authors, and it has been proposed that electrophoresis of fibrinogen should be made at 20°C. instead of at 4° (160). However, no difficulties were mentioned by Avery and Munro (25), and pure fibrinogen does not separate in the cold. Ware, Guest, and Seegers (303) prepared (with small yields) fibrinogen from frozen plasma by centrifugation in the cold. A clarification is needed of the relation of such observations to the possible presence of a "profibrin." Hammarsten (135) found a "soluble fibrin" in fibrinogen solutions after freezing and subsequent thawing, *i.e.*, in the same manner as Seegers *et al.* (303) isolated their "fibrinogen." Bordet and Gengou (41) described the agglutination of barium sulfate suspensions in fresh serum by means of a "soluble fibrin" and similar observations with India ink were made by Detre (72). The problem of profibrin formation has especially been dealt with by Apitz (2) and Wöhlisch (320). In order to remove the profibrin, Owren (233, p. 133) froze fibrinogen solutions, centrifuged the solution immediately after thawing, and then added kaolin or aluminum oxide as adsorbent for the profibrin. In this manner he ob-

tained fibrinogen solutions of constant reactivity. Fibrinogen can be precipitated from plasma by addition of 11% by volume of ether at 0° Kekwick (168) or by means of chloroform (114,206,221,269). According to Laki (173) it is possible to prepare crystalline fibrinogen from swine plasma. Nolf (225) destroys thrombin-forming components by addition of iodine.

Fibrinogen is a thread-shaped protein of high molecular weight. Holmberg (140) found a molecular weight of about 700,000, while Cohn *et al.* (61) and Edsall (81) found a molecular weight of about 500,000 with a length of 700 Å and an axial ratio of 18 (*cf.* Hall, 134). The amino acid composition of fibrin shows a remarkably high content of tryptophan. The physical and physicochemical properties of fibrinogen and fibrin have been the subject of a considerable number of investigations. They were excellently reviewed by Wöhlisch (320), who himself made important contributions. Further investigations were presented by Nanninga (217), who obtained a molecular weight for fibrinogen of 440,000. Only single investigations in this field bearing a more direct relationship to the problems dealt with in the present review will be mentioned here. Nor will the use of thrombin or fibrin for hemostatic or other clinical purposes be treated here.* Quick (248) wrote: "Clinically afibrinogenemia is unimportant." But Dam *et al.* (71) found, clinically, that premature detachment of the placenta (*ablatio placentae*) was connected with fibrinogenopenia.

Fibrinogen is most easily determined after clotting either by means of recalcification (28,67,127) or after addition of thrombin (233,239, 292). The last-mentioned procedure was studied in detail by Morrison (210). For the properties of the fibrin formed, see Ferry *et al.* (103).

B. CLOTTING OF FIBRINOGEN

The relation between clotting time and concentration of thrombin follows the double logarithmic straight curves mentioned in an earlier section for thromboplastin (9,152), but under favorable conditions reciprocity between the clotting time and thrombin concentration is obtained (9,41,179,205). The optimum pH for the action of thrombin on fibrinogen has been investigated by several authors. The problem

* See the series of papers in *Journal of Clinical Investigation*, Volume 23, 1944.

was dealt with in detail by Astrup (8,9), who obtained different results when acids instead of buffers were used for varying the pH . This discrepancy found its explanation in the influence of the salt concentration as expressed in the ionic strength of the solutions on the reaction. When the ionic strength was kept constant, reproducible results were obtained. The phosphate buffers commonly used in enzyme chemistry vary in ionic strength according to their composition, and give erroneous results as the optimum is changed to a more acid reaction. The inhibitory effect of neutral salts on the clotting has long been known (309); but Astrup could show that neutral salts, with the exception of salts with specific protein-denaturing ions, inhibited in accordance with the ionic strength of their solutions. This conclusion was not in conformity with the results of Glazko and Greenberg (126), but they allowed a complete explanation of his experimental results. Ferry and Morrison (102), in their studies on the conversion of human fibrinogen to fibrin under various conditions, also found the optimum pH at the neutral point, but found concentrated fibrinogen solutions to be less sensitive to changes in hydrogen ion concentration than more dilute solutions. They observed the increase in clotting time produced by increasing the ionic strength.

The extreme sensitivity of the fibrin formation to variations in the ionic strength of the solutions might be caused by the purely physical conversion of the soluble fibrinogen into the fibrin clot, and only to a lesser degree by the enzymic reaction proper. But Astrup (9) points out the possible importance of the ionic strength to enzyme reactions in general as an explanation of the so-called "salt effect." Of importance in this connection is the observation of Laki and Mommaerts (175) that fibrinogen is transformed into fibrin by a two-step reaction. The first reaction is a transformation under the influence of thrombin to a "profibrin," which then polymerizes to the fibrin proper. At acid reaction (pH 5.1) only the first reaction takes place, but the substance formed produces a clot when the mixture is neutralized. Only the last reaction is inhibited by addition of neutral salts (207).

Astrup (9) gives the results on page 32 for the pH optima of the thrombin action (in phosphate buffer). This means that it is possible by the action of thrombin (ox thrombin was used in all cases) to show that fibrinogen is species-specific, thus confirming previous results (see 14 and 169 for references).

Fibrinogen	Buffer of ionic strength 0.2	Buffer of molarity 0.2
Man	7.5	6.9
Horse	7.0	6.7
Ox	7.0	6.5
Chick	6.4	6.1

As mentioned above, fibrin adsorbs some of the thrombin present during its formation, but it is again released by action of the proteolytic enzyme in plasma (274,280). Hind (138) found that pepsin combined with fibrinogen at pH 5.0 to 5.6, yielding a noncoagulable compound. After treatment with alkali the fibrinogen regained its clotting power. The combination of pepsin with fibrinogen may be prevented by the presence in fresh serum and plasma of an inhibitory substance ("pepsin inhibitor"). This inhibitor can be removed from fibrinogen. He assumes that trypsin and the proteolytic plasma enzyme act in a similar manner, but his few experiments on this point are inconclusive and may be explained by a simple proteolytic splitting of the fibrinogen. Fibrinogen and fibrin are very easily broken down by tryptic enzymes and the fibrinolytic enzyme (plasmin, fibrinolysin) in plasma. The products first obtained are, in the case of plasmin, new proteins (140,150,163,281).

The nature of the reaction between thrombin and fibrinogen is still unknown notwithstanding the large amount of work done on this question. There is general agreement that the process is an enzymic reaction, but that is all. Wöhlisch (320) has treated this question, especially from a more physicochemical point of view. He supposes thrombin to act as a specific "denaturase" for fibrinogen, but Mommaerts (207) denies this and proposes the formation of a coacervate as an explanation. He is of the opinion that thrombin has an isoelectric point in the alkaline region, but this is contrary to previous results according to which thrombin is an acid protein (12,204,272). The physical properties of the fibrin formed have been studied thoroughly by the Harvard group (*cf.* 79 and 102). The hypothesis that thrombin is a proteolytic enzyme is now regarded as obsolete, as all the nitrogen in purified fibrinogen may be recovered as fibrin (150,303). Most probably thrombin acts as a specific polymerase, but the underlying chemical reactions are completely unknown.

Jaques (154) found that oxidizing agents such as iodine, permanga-

nate, dichromate, and hydrogen peroxide produced precipitates in a fibrinogen solution. Fibrinogen does not give the nitroprusside reaction for free thiol groups and he assumes that the oxidation takes place at other points of the molecule. Fibrinogen treated with H_2O_2 still yielded normal clots with thrombin. The reducing power of fibrinogen toward H_2O_2 was not changed by denaturation but increased during conversion to fibrin. Chargaff *et al.* (59) observed the formation of fibrin clots when a number of oxidizing or decarboxylating agents (choramine-T, α -naphthoquinone sulfonate, ninhydrin) acted on fibrinogen. They could, however, not find any safe evidence for a development of CO_2 during the clotting of fibrinogen by thrombin or for the need of atmospheric oxygen for the process. The conversion of SH groups into disulfide linkages during clotting was recently suggested (29), but this oxidative reaction needs the presence of a hydrogen acceptor, the existence of which has not been proved. As far as can be deduced from existing experiments it cannot be atmospheric oxygen, but the reaction might be an intermolecular oxidation-reduction of different groupings in the fibrinogen molecules. Nanninga (217) and Edsall (79) could not confirm Lyons' results (29); his polarographic experiments were criticized by Jaques (155) (*cf.* 163).

Fibrinogen is clotted by certain bacterial enzymes. Some of these act directly on fibrinogen (staphylocoagulase) and not through the conversion of prothrombin into thrombin. They may need, however, the presence of an "activator substance" associated with the albumin in blood plasma (*cf.* 119). But these questions will not be dealt with here.

IV. Inhibition of Coagulation

The coagulation process may be inhibited at different points. The formation of thrombin may be prevented by specific inhibitors (other than calcium-binding compounds). The possible occurrence of thromboplastinogen inhibitors was mentioned in a preceding section, and it is known that heparin may act on this stage of the coagulation (*cf.* 7,47,93,99). The most important developments, however, have been concerned with heparin and antithrombin, and only these will therefore be discussed in this review.

A. HEPARIN

The monograph on heparin of Jorpes (162) appeared in a new edition in 1946. It covers most of the field and needs only few additions.

Kuizenga and Spaulding (172) improved the autolysis in the original method of Charles and Scott and obtained more than double yields of heparin from beef lung. The splitting of proteins with pepsin or papain (121) or removal by means of phenol (141) has been recommended. Heparin can be directly extracted from tissues by potassium thiocyanate (287). The molecular weight of heparin was found to be 17,000 (132,159). The inactivation experiments of Wolfrom *et al.* (325) were also confirmed in the above experiments. The decrease in activity is not due to a depolymerization of the molecule. In electrophoresis they found two components, the fastest moving component being the most active. In previous electrophoresis experiments (60,315,324) only one active component was found. The heterogeneity of heparin has especially been pointed out by Jorpes (161). Heparin from different animal species showed great variations in activity (Jaques *et al.*, 158), the dog yielding the most potent preparation. These results were questioned, however (323). An acetyl derivative containing all activity may be prepared from heparin (30).

One of the most important chemical properties of heparin is its ability to combine with proteins in a reversible manner. With protamines a precipitation of a protamin-heparin compound is obtained (Fischer, 107). This reaction was used in neutralizing heparin (Chargaff and Olson, 57). The compound is split by trypsin (111). The combination with proteins follows the law of mass action (113) and this reaction was studied in detail by Jaques (153). The metachromatic activity of heparin was studied by Jaques *et al.* (156). This reaction cannot be used as a means of determining the amount of heparin present, since biological materials might contain substances producing the color change without showing inhibition of the clotting (4,192). The metachromatic substance in yeast cells was found to be a polyphosphate compound (310).

As is well known, heparin disappears rapidly from the blood stream after injection. Some is excreted through the kidneys, partly by tubular secretion (Piper, 242). The remainder disappears in the organism; but the low activity of the heparin-destroying enzyme, heparinase, found by Jaques (151) suggests that it is not the primary agent causing the disappearance. Several attempts have been made to prepare synthetic anticoagulants as inexpensive substitutes for heparin

without these drawbacks (from a practical point of view). In a study of the action of synthetic polysaccharide sulfuric acids by means of the double logarithmic graphs previously mentioned, Astrup *et al.* (20) found that, while the slopes of the curves obtained at different levels of heparin increased with increasing concentrations of heparin as described by Fischer (108), cellulosetrisulfuric acid yielded straight lines of the original slope, indicating much less dependence on the presence of large amounts of thromboplastin. The relative action of heparin and the cellulose compound therefore depends upon the amount of thromboplastin present (21). The starch derivative reacts in a similar manner, while chitindisulfuric acid is in between. Such qualitative differences were also described by Piper (241). The reason for this discrepancy was found later when it was noted that the synthetic anticoagulants interact with fibrinogen and may produce a precipitate (24). Parallel straight curves were obtained when the concentration of fibrinogen was varied (27). Similar results were found for another anticoagulant, Liguoid-Roche (32). The interaction with fibrinogen may also explain the toxic properties of the synthetic compounds, as they all agglutinate the blood platelets (Piper, 240). The precipitation of fibrinogen by protamine may be recalled here (215). Synthetic anticoagulants of the heparin type may be prepared from various high-molecular polyalcohols ranging from polyvinyl alcohol (56) to dextran (132) and inulin (148). An anticoagulant of another type is the crystalline trypsin inhibitor isolated from soybeans (*cf.* 190,293). Pure heparin seems to produce a slight degree of platelet agglutination (*cf.* 65). The change in the slope of the double logarithmic curves in the presence of heparin was used as a means of measuring the heparin content of blood (257). Heparin does not prevent the action of staphylocoagulase (114,264).

B. ANTITHROMBIN AND HEPARIN

Not much is known about the mode of action of heparin except that a plasma factor is necessary for its inhibitory activity (*cf.* 52). The antithrombic effect is the best known. The measurement of anti-thrombin has been described by Astrup and Darling (16), whose method is based on the addition of an excess of a potent thrombin and the measurement of the amount remaining after neutralization. The technique was also used in measuring the antithrombin formed from heparin (18). It should be noted here that the clotting time in this method is determined as the moment when the fibrin begins to separate as threads. A complete clot is not always obtained, especially in the presence of heparin, in which instance the structure of the clot is changed. The point of flocculation is not changed in purified fibrinogen solutions. These investigations revealed that the normal anti-thrombin present in plasma is not identical with the factor essential to the action of heparin. This factor was therefore given the preliminary term "thrombin coinhibitor," and the compound formed

with heparin was called "thrombin inhibitor." The normal antithrombin and the thrombin coinhibitor were found in different fractions of plasma, although both seem to belong to the albumins. An unexplained discrepancy with the results of previous authors arose, as it was not possible to find any coinhibitor in serum (ox)—only in the plasma. It seemed to be destroyed during coagulation or heat treatment. The compound formed with heparin was found to be a dissociable compound, the inhibitory activity rising to a maximal limit when excess of heparin was added. The reaction between this substance and thrombin seems also to be an equilibrium. The thrombin coinhibitor was found to be very thermolabile, but the normal antithrombin was rather thermostable.

The existence of two types of antithrombin was proved definitely by Volkert (300), in his monograph on antithrombin and heparin and in additional papers (299). Volkert discovered that the antithrombin in rabbit blood increased to the same maximal value after repeated injections of solutions of high-molecular compounds (proteins, gum arabic, soluble starch), in anaphylactic shock, in obstructive jaundice, and after injection of heparin. The increase caused by the high-molecular compounds was obtained only after sensitization. It did not appear after injections of corpuscular antigens (bacterial cells, yeast cells). The maximal increase obtained through physiological reactions did not rise further when heparin was injected or added *in vitro*. The component responsible for this increase seems therefore identical with the factor essential to the inhibitory action of heparin. When India ink was injected into normal rabbits, only a slight decrease in antithrombin, 15–20%, was observed. On the other hand, when India ink was administered, after the maximal increase was obtained, the antithrombin decreased immediately to normal values regardless of the manner in which the increase was produced. Treatment of the rabbits with India ink before the increase prevented any subsequent rise. When India ink or chloroform was added to blood samples *in vitro* a similar decrease was obtained, but not when it was added to the plasma. When isolated red blood cells were treated with India ink, and then, after washing, added to the plasma, a decrease to normal values was produced. All these experiments point definitely to the existence of two types of antithrombin one being normally present in plasma, and the other being produced by combination of heparin or a similar compound with a protein present

in the plasma. These two antithrombins are very different from a physiological point of view, thus confirming the previous chemical results.

Volkert's results gained in importance after it was shown by Allen *et al.* (1) that the decreased coagulability of the blood after intense ionizing irradiation or administration of nitrogen mustard evidently is produced by heparin and can be prevented by injection of protamine or toluidine blue (193). Volkert found an increased amount of antithrombin in a considerable number of cases of leukemia and in some progressive thrombotic conditions, but not in acute thrombosis or after operation. In comparing his results with those of Allen *et al.* it must be remembered that, while Volkert measured the antithrombin as such by its neutralizing effect on thrombin, Allen's group measured the clotting time after addition of protamine or toluidine blue, thus obtaining results depending chiefly on the activation process in blood clotting. In none of his experimental conditions did Volkert find any significant increase of the spontaneous clotting time when the amount of antithrombin was increased. These results point to a difference between antithrombin and a simple addition of heparin.

Ferguson and Glazko (99,124) are of the opinion that the normal antithrombic activity is due to a proteolytic enzyme ("progressive antithrombin"), while the antithrombin formed from heparin acts as an "immediate antithrombin." They measure the progressive antithrombin by the velocity of the inhibiting reaction, while immediate antithrombin is found to yield a linear relationship between concentration and clotting time.

Seegers and Smith (284) regard heparin as a catalyst accelerating the reaction between thrombin and the plasma cofactor, and they describe the measurement of this cofactor.

Wilson (316) measures the amount of thrombin neutralized after 4 minutes at 28°C. Only incomplete reaction is obtained under these conditions. Wilson's method will reflect more the velocity of the reaction than the amount of antithrombin present, although heparin if present will probably show up in his method. A similar technique was used by Owen and Bollman (231). For the determination of heparin by the slope of the double logarithmic curve obtained by addition of dilutions of thromboplastin, see the paper by Quivy mentioned above (257).

Quite recently, Monkhouse, Stewart, and Jaques (208) published a

new method for the determination of heparin in blood based on its precipitation with octylamine and it seems to be the most sensitive chemical method yet devised. Herbert (137) found that plasma combined with a certain fraction of the thrombin independent of the concentration of thrombin. This observation is difficult to correlate with the results of other authors leading to complete saturation after 15 minutes at 37°C. According to Feissly and Enowicz (93) the cofactor essential to the action of heparin as an antithrombin differs from the cofactor necessary for its antiprothrombic effect. The method of Astrup and Darling (16) for measuring antithrombin was, in addition to the studies by Volkert already mentioned, used by Nielsen (218) and Hurn *et al.* (147) for clinical and physiological investigations. It may be added that this method measures the sum of normal antithrombin and the antithrombic substance formed from heparin.

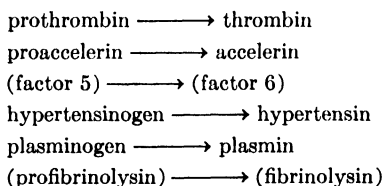
The substance formed from thrombin and antithrombin has been known as "metathrombin" because it has been supposed to be able to yield active thrombin again upon treatment with alkali. It was pointed out by Astrup and Darling (18) that it is the reaction between thrombin and normal antithrombin that may be supposed to yield metathrombin, while the compound formed from the interaction with heparin plus cofactor seems to be of another nature. The relation between antithrombin and metathrombin was discussed especially by Wöhlisch (322), but the problems remain unsolved. It has been mentioned by Lenggenger (180) that the possible explanation of the alleged reactivation of thrombin from metathrombin may be a formation of new thrombin by activation of prothrombin. The activation experiments of Mellanby (198) using alkali may be recalled here.

V. Conclusion

The amount of work dealing with the reactions which lead to the formation of thrombin has been extensive and of great importance. It has therefore taken up a considerable part of the present critical treatment. Other aspects have been treated rather superficially and some not at all. However, it seemed of greater importance to the general reader that he should be given a rather careful treatment of an important, although restricted field, than to have a broad but necessarily more superficial view presented. In that case he could just as

easily collect his information from current annual reviews. The field of blood clotting has developed to such an extent that in the future probably any thorough treatment will have to be restricted to certain pertinent parts of the whole complex in order to fulfill its purpose without becoming too voluminous. That is the reason for not incorporating in this paper a section on fibrinolysis.

Only one comment of a more general nature will be added here: In the living organism blood serves as a medium performing several functions on which the existence of the organism depends. Oxygen, nutritive substances, and vitamins are taken up and transported to the various tissues. Hormones are carried from the producing organ to the site of reaction in the tissues. It was pointed out recently by Astrup and Permin (22), in connection with studies on the tissue activator of the fibrinolytic enzyme in blood, that blood is not always a passive transporting medium. We must add a new mechanism according to which the circulating blood carries a certain stock of proteins serving as precursors of biologically active substances. Upon the introduction of specific activating substances into the blood stream, these precursors will be transformed into substances of highly specific biological activity. Thus the following reactions may occur:



Evidently this mechanism furnishes the organism with a reaction by which an urgently needed biologically active substance can be produced in amounts very rapidly at the place at which it will be used. The general nature of this mechanism is further strengthened by the recent discovery by Rocha e Silva (267) of the formation of a depressor substance, bradykinin, in blood by a similar reaction.

References

1. Allen, J. G., Sanderson, M., Milham, M., Kirschon, A., and Jacobson, L. O., *J. Exptl. Med.*, **87**, 71 (1948). Allen, J. G., and Jacobson, L. O., *Science*, **105**, 388 (1947). Smith, T. R., Jacobson, L. O., Spurr, C. L., Allen, J. G., and Block, M. H., *Science*, **107**, 474 (1948).
2. Apitz, K., *Z. ges. exptl. Med.*, **101**, 552 (1937); **102**, 202 (1938); **103**, 417 (1938); **105**, 88 (1939).

3. Arthus, M., *Compt. rend. soc. biol.*, **53**, 1024 (1901); *J. Physiol. Pathol.*, **4**, 1 (1902).
4. Astrup, P., *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **3**, 165 (1947). Cf. Best, C. H., and Jaques, L. B., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **49**, 501 (1948).
5. Astrup, T., *Nature*, **141**, 1057 (1938); *Enzymologia*, **5**, 119 (1938).
6. Astrup, T., *Nature*, **144**, 76 (1939); *Enzymologia*, **9**, 337 (1941).
7. Astrup, T., *Science*, **90**, 36 (1939).
8. Astrup, T., *Biochem. Z.*, **313**, 229 (1942).
9. Astrup, T., *Biochemistry of Blood Coagulation*, Copenhagen, 1944; also in *Acta Physiol. Scand.*, **7**, Suppl. No. 21 (1944).
10. Astrup, T., *Acta Chem. Scand.*, **1**, 744 (1947).
11. Astrup, T., and Darling, S., *J. Biol. Chem.*, **133**, 761 (1940).
12. Astrup, T., and Darling, S., *Acta Physiol. Scand.*, **2**, 22 (1941).
13. Astrup, T., and Darling, S., *Acta Physiol. Scand.*, **3**, 168 (1942).
14. Astrup, T., and Darling, S., *Acta Physiol. Scand.*, **3**, 311 (1942).
15. Astrup, T., and Darling, S., *Acta Physiol. Scand.*, **4**, 45 (1942).
16. Astrup, T., and Darling, S., *Acta Physiol. Scand.*, **4**, 293 (1942). Astrup, T., Selsø, S., and Volkert, M., *Biochem. Z.*, **315**, 303 (1943).
17. Astrup, T., and Darling, S., *Naturwissenschaften*, **30**, 63 (1942).
18. Astrup, T., and Darling, S., *Acta Physiol. Scand.*, **5**, 13 (1943).
19. Astrup, T., and Darling, S., *Acta Physiol. Scand.*, **5**, 97 (1943).
20. Astrup, T., Galsmar, I., and Volkert, M., *Acta Physiol. Scand.*, **8**, 215 (1944).
21. Astrup, T., and Galsmar, I., *Acta Physiol. Scand.*, **8**, 361 (1944).
22. Astrup, T., and Permin, P. M., *Nature*, **159**, 681 (1947).
23. Astrup, T., and Permin, P. M., *Nature*, **161**, 689 (1948).
24. Astrup, T., and Piper, J., *Acta Physiol. Scand.*, **11**, 211 (1946).
25. Avery, A., and Munro, F. L., *Arch. Biochem.*, **16**, 33 (1948).
26. Barratt, J. O. W., *J. Physiol. London*, **80**, 422 (1934).
27. Barsøe, O. C., and Selsø, S., *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **2**, 367 (1946).
28. Baumann, J., *Z. ges. exp. Med.*, **68**, 707 (1929).
29. Baumberger, J. P., *Am. J. Physiol.*, **133**, 206 (1941). Lyons, R. N., *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, **23**, 131 (1945); *Nature*, **155**, 633 (1945).
30. Bell, H. J., and Jaques, L. B., *Can. J. Research*, **B25**, 472 (1947).
31. Bertrand, I., and Quivy, D., *Compt. rend. soc. biol.*, **138**, 212, 304, 434, 472, 761, 790 (1944); **139**, 18, 20, 603 (1945).
32. Bertrand, I., and Quivy, D., *Compt. rend. soc. biol.*, **138**, 404 (1944).
33. Bertrand, I., and Quivy, D., *Compt. rend. soc. biol.*, **139**, 130 (1945).
34. Biggs, R., and MacFarlane, R. G., *J. Clin. Path.*, **2**, 33 (1949).
35. Bird, R. M., McSwain, B., Kauer, G. L., and Glenn, F., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **48**, 730 (1941).
36. Bjerkelund, C., and Owren, P. A., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **1**, 162 (1949).
37. Bleibtreu, M., *Arch. ges. Physiol. (Pflügers)*, **213**, 642 (1926).
38. *Blood Clotting and Allied Problems*. Transactions of the First Conference, Josiah Macy, Jr., Foundation, New York, 1948.
39. Bordet, J., and Delange, L., *Ann. inst. Pasteur*, **26**, 657, 737 (1912).
40. Bordet, J., and Delange, L., *Berlin klin. Wochschr.*, **51**, 497 (1914); *Bull. soc. roy. sci. med. nat., Bruxelles*, **1914**, No. 4. Bordet, J., *Compt. rend. soc. biol.*, **82**, 896, 1139 (1919); **83**, 576 (1920).
41. Bordet, J., and Gengou, O., *Ann. inst. Pasteur*, **18**, 26 (1904).
42. Bordet, J., and Gengou, O., *Ann. inst. Pasteur*, **18**, 98 (1904).
43. Bordet, J., *Ann. inst. Pasteur*, **34**, 561 (1920).
44. Brambel, C. E., and Loker, F. F., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **53**, 218 (1943).

45. Brinkhous, K. M., *Am. J. Med. Sci.*, **198**, 509 (1939).
46. Brinkhous, K. M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **66**, 117 (1947).
47. Brinkhous, K. M., Smith, H. P., Warner, E. D., and Seegers, W. H., *Am. J. Physiol.*, **125**, 683 (1939); *Science*, **90**, 539 (1939).
48. Campbell, H. A., Smith, W. K., Roberts, W. L., and Link, K. P., *J. Biol. Chem.*, **138**, 1 (1941).
49. Carpenter, G., and Allen, J. G., *Am. J. Med. Sci.*, **202**, 655 (1941).
50. Chak, I. M., and Giri, K. N., *Nature*, **161**, 354 (1948).
51. Chanutin, A., Ludewig, S., and Masket, A. V., *J. Biol. Chem.*, **143**, 737, 753, 763 (1942).
52. Chargaff, E., in *Advances in Enzymology*, Vol. V, Interscience, New York, 1945, p. 31.
53. Chargaff, E., *J. Biol. Chem.*, **160**, 351 (1945).
54. Chargaff, E., *J. Biol. Chem.*, **161**, 389 (1945).
55. Chargaff, E., *J. Biol. Chem.*, **173**, 253 (1948).
56. Chargaff, E., Bancroft, F. W., and Stanley-Brown, M., *J. Biol. Chem.*, **115**, 155 (1936).
57. Chargaff, E., and Olson, K. B., *J. Biol. Chem.*, **122**, 153 (1937).
58. Chargaff, E., and West, R., *J. Biol. Chem.*, **166**, 189 (1946).
59. Chargaff, E., and Ziff, M., *J. Biol. Chem.*, **138**, 787 (1941). Chargaff, E., and Bendich, A., *J. Biol. Chem.*, **149**, 93 (1943).
60. Chargaff, E., Ziff, M., and Moore, D. H., *J. Biol. Chem.*, **139**, 383 (1941).
61. Cohn, E. J., Oneley, J. L., Strong, L. E., Hughes, W. L., and Armstrong, S. H., *J. Clin. Invest.*, **23**, 417 (1944).
62. Cohn, E. J., Strong, L. G., Hughes, W. L., Jr., Mulford, D. J., Ashworth, J., Melin, M., and Taylor, H. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 459 (1946).
63. Collingwood, B. J., and MacMahon, M. T., *J. Physiol.*, **45**, 119 (1913).
64. Conley, C. L., and Morse, W. I., *Am. J. Med. Sci.*, **215**, 158 (1948).
65. Copley, A. L., and Robb, T. P., *Am. J. Clin. Path.*, **12**, 416, 536 (1942). Fidlar, E., and Jaques, L. B., *J. Lab. Clin. Med.*, **33**, 1410 (1948). Quick, A. J., Shanberge, J. N., and Stefanini, M., *J. Lab. Clin. Med.*, **33**, 1424 (1948).
66. Correll, J. T., and Wise, E. C., *Surg. Gynecol. Obstet.*, **85**, 211 (1947).
67. Cullen, C. E., and Van Slyke, D. D., *J. Biol. Chem.*, **41**, 587 (1920).
68. Dale, H. H., and Walpole, G. S., *Biochem. J.*, **10**, 331 (1916).
69. Dam, H., *Vitamins and Hormones*, **6**, 27 (1948); *Advances in Enzymology*, **2**, 285 (1942).
70. Dam, H., *Nature*, **161**, 1010 (1948). Dam, H., and Søndergaard, E., *Biochim. et Biophys. Acta*, **2**, 409 (1948).
71. Dam, H., Larsen, H., and Plum, P., *Ugeskrift Laeger*, **103**, 257 (1941).
72. Detre, L., *U. S. Pub. Health Repts.*, **53**, 831 (1938).
73. Deutsch, H. F., and Gerarde, H. W., *J. Biol. Chem.*, **166**, 381 (1946).
74. Dyckerhoff, H., v. Behm, W., Goossens, N., and Miehler, H., *Biochem. Z.*, **288**, 271 (1936). Dyckerhoff, H., and Grünwald, O., **315**, 124 (1943).
75. Dyckerhoff, H., Glamsar, H., and Widmann, K., *Biochem. Z.*, **314**, 250 (1943).
76. Eagle, H., *J. Gen. Physiol.*, **18**, 531, 547 (1935).
77. Edsall, G., *Am. J. Physiol.*, **134**, 609 (1941).
78. Edsall, J. T., *Advances in Protein Chemistry*, **3**, 383 (1947).
79. Edsall, J. T., in *Blood Clotting and Allied Problems*. Transactions of the First Conference, Josiah Macy, Jr., Foundation, New York, 1948, p. 49.
80. Edsall, J. T., Ferry, R. M., and Armstrong, S. H., *J. Clin. Invest.*, **23**, 557 (1944).

81. Edsall, J. T., Foster, J. F., and Scheinberg, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2731 (1947).
82. Erickson, B. N., and Ferguson, J. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **45**, 579 (1940).
83. Fahey, J. L., Olwin, J. H., and Ware, A. G., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **69**, 491 (1948).
84. Fantl, P., and Everard, B. A., *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, **27**, 197 (1949).
85. Fantl, P., and Nance, M. H., *Nature*, **158**, 708 (1946); *Australian J. Sci.*, **9**, 117 (1946).
86. Fantl, P., and Nance, M. H., *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, **25**, 95 (1947).
87. Fantl, P., and Nance, M. H., *Nature*, **159**, 777 (1947).
88. Fantl, P., and Nance, M. H., *Med. J. Australia*, **1948**, 128; *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, **26**, 207 (1948).
89. Fantl, P., Rome, M. N., and Nance, M. H., *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, **25**, 183 (1947).
90. Feissly, R., *Helv. Med. Acta*, **8**, 823 (1941); **10**, 3 (1943); **11**, 177 (1944); **12**, 215, 467 (1945); **13**, 313 (1946).
91. Feissly, R., *Schweiz. med. Wochschr.*, **75**, 696 (1945).
92. Feissly, R., *Schweiz. med. Wochschr.*, **77**, 427 (1947).
93. Feissly, R., and Enowicz, M., *Schweiz. med. Wochschr.*, **76**, 274 (1946).
94. Ferguson, J. H., *Am. J. Physiol.*, **117**, 587 (1936); *J. Lab. Clin. Med.*, **24**, 273 (1938).
95. Ferguson, J. H., *Physiol. Revs.*, **16**, 640 (1936).
96. Ferguson, J. H., *Am. J. Physiol.*, **119**, 755 (1937); **123**, 341 (1938); *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **34**, 797 (1936).
97. Ferguson, J. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **46**, 80 (1941).
98. Ferguson, J. H., and Erickson, B. N., *Am. J. Physiol.*, **126**, 661 (1939).
99. Ferguson, J. H., and Glazko, A. J., *Am. J. Physiol.*, **134**, 47 (1941).
100. Ferguson, J. H., and Lewis, J. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **67**, 228 (1948).
101. Ferguson, J. H., Travis, B. L., and Gerheim, E. B., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **64**, 302 (1947).
102. Ferry, J. D., and Morrison, P. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 388 (1947).
103. Ferry, J. D., and Morrison, P. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 400 (1947). Ferry, J. D., Singer, M., Morrison, P. R., Porsche, J. D., and Kutz, R. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 409 (1947).
104. Finkelstein, M., *Nature*, **155**, 202 (1945). Zondek, B., and Finkelstein, M., *Proc. Soc., Exptl. Biol. Med.*, **60**, 374 (1945).
105. Fischer, A., *Biochem. Z.*, **264**, 169, 178, 184 (1933); **270**, 235, 250, 261, 275 (1934).
106. Fischer, A., *Biochem. Z.*, **264**, 169 (1933).
107. Fischer, A., *Biochem. Z.*, **278**, 133 (1935).
108. Fischer, A., *Biochem. Z.*, **278**, 320 (1935).
109. Fischer, A., *Biochem. Z.*, **278**, 334 (1935).
110. Fischer, A., *Biochem. Z.*, **279**, 108 (1935).
111. Fischer, A., *Enzymologia*, **5**, 34 (1938).
112. Fischer, A., *Acta Physiol. Scand.*, **3**, 54 (1941).
113. Fischer, A., and Astrup, T., *Biochem. Z.*, **278**, 326 (1935). Astrup, T., *Enzymologia*, **2**, 377 (1938).
114. Fredericq, P., *Arch. intern. physiol.*, **52**, 73 (1942). Cf. Bordet, P., *Arch. intern. physiol.*, **31**, 47 (1929).

115. Fuchs, H. J., *Ergeb. Enzymforsch.*, **2**, 282 (1933).
116. Fuld, E., *Beiträge chem. Physiol. Pathol.*, **2**, 514 (1902).
117. Fullerton, H. W., *Lancet*, **239**, 195 (1940).
118. Fulton, L. D., and Page, E. W., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **68**, 594, 596 (1948).
119. Gerheim, E. B., Ferguson, J. H., and Travis, B. L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **66**, 525 (1947); **71**, 258 (1949).
120. German Pat. 708,613 (application Oct. 8, 1937). Dyckerhoff, H., Marx, R., and Ludwig, B., *Z. ges. exptl. Med.*, **110**, 412 (1942).
121. German Pat. 712,564.
122. Glavind, J., *Studies on the Coagulation of Crustacean Blood*. Copenhagen, 1938.
123. Glazko, A. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **64**, 444 (1947).
124. Glazko, A. J., and Ferguson, J. H., *J. Gen. Physiol.*, **24**, 169 (1940); *Am. J. Physiol.*, **134**, 54 (1941).
125. Glazko, A. J., and Ferguson, J. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **45**, 43 (1940).
126. Glazko, A. J., and Greenberg, D. M., *Am. J. Physiol.*, **128**, 399 (1940).
- 126a. Graham, J. B., Buckwalter, J. A., Hartley, L. J., and Brinkhous, K. M., *J. Exptl. Med.* **90**, 97 (1949).
127. Gram, H. C., *J. Biol. Chem.*, **49**, 279 (1921).
128. Gratia, A., *Compt. rend. soc. biol.*, **82**, 1247 (1919); *Ann. inst. Pasteur*, **35**, 513 (1921).
129. Gratia, A., *Brit. Med. J.*, **2**, 296 (1922).
130. Gratia, A., and Fredericq, P., *Compt. rend. soc. biol.*, **126**, 906 (1937).
131. Greenberg, D. M., *Advances in Protein Chemistry*, **1**, 121 (1944).
132. Grönwall, A., Ingelman, B., and Mosiman, H., *Uppsala Läkarefören. Förh.*, **50**, 397 (1945).
133. Guidi, G., *Arch. intern. pharmacodynamie*, **37**, 305 (1930).
134. Hall, C. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 1138 (1949).
135. Hammarsten, O., *Arch. ges. Physiol. (Pflügers)*, **19**, 563 (1879).
136. Hammarsten, O., *Z. physiol. Chem.*, **28**, 98 (1899).
137. Herbert, F. K., *Biochem. J.*, **34**, 1554 (1940).
138. Hind, H. G., *Biochem. J.*, **37**, 289, 293 (1943).
139. Hirose, R. S., *Am. J. Physiol.*, **107**, 693 (1934).
140. Holmberg, C. G., *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.*, **A17**, No. 28 (1944).
141. Homan, J. D. H., and Lens, J., *Biochim. et Biophys. Acta*, **2**, 333 (1948).
142. Honorato, R., *Am. J. Physiol.*, **150**, 381 (1947). Honorato, R., and Quick, A. J., *Am. J. Physiol.*, **150**, 405 (1947).
143. Howell, W. H., *Am. J. Physiol.*, **26**, 453 (1910); **32**, 264 (1913).
144. Howell, W. H., *Physiol. Revs.*, **15**, 435 (1935).
145. Howell, W. H., *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **76**, 295 (1945).
146. Hudemann, S., *Kolloid-Z.*, **92**, 189 (1940).
147. Hurn, M., Barker, N. W., and Mann, F. D., *Am. J. Clin. Path.*, **17**, 709, 712 (1948). Hurn, M., and Mann, F. D., *Am. J. Clin. Path.*, **17**, 741 (1948).
148. Ingelman, B., *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.*, **B24**, No. 5 (1946).
149. Jacox, R. F., and Bays, R. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **70**, 587 (1949). Jacox, R. F., *J. Clin. Invest.*, **28**, 492 (1949).
150. Jaques, L. B., *Biochem. J.*, **32**, 1181 (1938).
151. Jaques, L. B., *J. Biol. Chem.*, **133**, 445 (1940).
152. Jaques, L. B., *J. Physiol.*, **100**, 275 (1941).
153. Jaques, L. B., *Biochem. J.*, **37**, 189 (1943).

154. Jaques, L. B., *Biochem. J.*, **37**, 344 (1943). Jaques, L. B., and Bell, H. J., *Can. J. Research*, **E24**, 79 (1946).
155. Jaques, L. B., in *Blood Clotting and Allied Problems*. Transactions of the First Conference, Josiah Macy, Jr., Foundation, New York, 1948, p. 58.
156. Jaques, L. B., Bruce-Mitford, M., and Ricker, A. G., *Rev. can. biol.*, **6**, 740 (1947).
157. Jaques, L. B., Fidler, E., Feldsted, E. T., and Macdonald, A. G., *Can. Med. Assoc. J.*, **55**, 26 (1946).
158. Jaques, L. B., and Waters, E. T., *J. Physiol.*, **99**, 454 (1941). Jaques, L. B., *Science*, **92**, 488 (1941). Jaques, L. B., Waters, E. T., and Charles, A. F., *J. Biol. Chem.*, **144**, 229 (1942).
159. Jensen, R., Snellman, O., and Sylvén, B., *J. Biol. Chem.*, **174**, 265 (1948).
160. Johnson, P., and Shooter, E. M., *J. Colloid Sci.*, **3**, 539 (1948).
161. Jorpes, E., *Biochem. J.*, **36**, 203 (1942); *Z. physiol. Chem.*, **278**, 7 (1943). Jorpes, J. E., and Gardell, S., *J. Biol. Chem.*, **176**, 267 (1948). Jorpes, J. E., Werner, B., and Aaberg, B., *ibid.*, **176**, 277 (1948).
162. Jorpes, J. E., *Heparin in the Treatment of Thrombosis*. 2nd ed., Oxford University Press, London, 1946.
163. Jühling, L., Tropp, C., and Wöhlisch, E., *Z. physiol. Chem.*, **262**, 210 (1939). Tropp, C., Jühling, L., and Geiger, F., *Z. physiol. Chem.*, **262**, 225 (1939).
164. Kazal, L. A., and Arnow, L. E., *Arch. Biochem.*, **1**, 169 (1943).
165. Kazal, L. A., and Arnow, L. E., *Arch. Biochem.*, **4**, 183 (1944).
166. Kazal, L. A., Higashi, A., De Young, M., and Barnes, R. H., *Arch. Biochem.*, **10**, 173 (1946).
167. Kazal, L. A., Higashi, A., De Young, M., Brahinsky, R., and Barnes, R. H., *Arch. Biochem.*, **10**, 183 (1946).
168. Kekwick, R. A., Mackay, M. E., and Record, B. R., *Nature*, **157**, 629 (1946).
169. Kenton, H. B., *J. Immunol.*, **25**, 461 (1933).
170. Klotz, I. M., *Arch. Biochem.*, **9**, 109 (1946).
171. Kugelmass, I. N., *Compt. rend. soc. biol.*, **87**, 802 (1922); *Arch. intern. Physiol.*, **21**, 139 (1923).
172. Kuizenga, M. H., and Spaulding, L. B., *J. Biol. Chem.*, **148**, 641 (1943).
173. Laki, K., *Z. physiol. Chem.*, **273**, 95 (1942).
174. Laki, K., *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, **3**, 5 (1943). *Schweiz. med. Wochschr.*, **74**, 13 (1944).
175. Laki, K., and Mommaerts, W. F. H. M., *Nature*, **156**, 664 (1945). Laki, K., and Mihalyi, E., *Nature*, **163**, 66 (1949).
176. Larson, C. E., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **44**, 554 (1940).
177. Leathes, J. B., and Mellanby, J., *J. Physiol.*, **96**, 39P (1939).
178. Lebel, H., Schönheyder, F., and Muus, J., *Skand. Arch. Physiol.*, **78**, 179 (1938).
179. Legler, R. G., *Helv. Chim. Acta*, **26**, 1512, 1673 (1943).
180. Lenggenhager, K., *Helv. Med. Acta*, **1**, 527 (1935).
181. Lenggenhager, K., *Mitt. Grenzg. Med. Chir.*, **44**, 425 (1936).
182. Lenggenhager, K., *Helv. Med. Acta*, **7**, 262 (1940); *Schweiz. Med. Wochschr.*, **76**, 411 (1946).
183. Lenggenhager, K., *Ueber die Entstehung, Erkennung und Vermeidung der postoperativen Fernthrombose*, Leipzig, 1941.
184. Létard, H., *Compt. rend. soc. biol.*, **135**, 203 (1941).
185. Link, K. P., Harvey Lectures, **39**, 162 (1944). Also *Blood Clotting and Allied Problems*, Transactions of the First Conference, Josiah Macy, Jr., Foundation, New York, 1948, p. 128.

186. Loomis, E. C., and Seegers, W. H., *Arch. Biochem.*, **5**, 265 (1945).
187. Loomis, E. C., and Seegers, W. H., *Am. J. Physiol.*, **148**, 263 (1947).
188. Lozner, E. L., Jolliffe, L. S., and Taylor, F. H. L., *Am. J. Med. Sci.*, **199**, 318 (1940).
189. McDonald, M. R., and Kunitz, M., *J. Gen. Physiol.*, **25**, 53 (1941); **29**, 155 (1946).
190. Macfarlane, R. G., and Pilling, J., *Lancet*, **1**, 888 (1946). Macfarlane, R. G., *J. Physiol.*, **106**, 104 (1947).
191. Macfarlane, R. G., Trevan, J. W., and Attwood, M. P., *J. Physiol.*, **99**, 7P (1941).
192. MacIntosh, F. C., *Biochem. J.*, **35**, 771, 776 (1941).
193. Mackowiak, E. J., and Barnard, R. D., *J. Am. Pharm. Assoc.*, **36**, 383 (1947). Barnard, R. D., *J. A. M. A.*, **136**, 573 (1948). Dixon, F. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **68**, 505 (1948).
194. MacMillan, R. L., *Science*, **108**, 416 (1948).
195. Mann, F. D., Hurn, M., and Magath, T. B., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **66**, 33 (1947).
196. Mann, F. D., and Hurn, M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **67**, 83 (1948).
197. Mawson, C. A., *Biochem. J.*, **44**, 11P (1949).
198. Mellanby, J., *J. Physiol.*, **38**, 28 (1909).
199. Mellanby, J., *Proc. Roy. Soc. London*, **B107**, 271 (1930); **B113**, 93 (1933).
200. Mertz, E. T., Seegers, W. H., and Smith, H. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **41**, 657 (1939).
201. Mertz, E. T., Seegers, W. H., and Smith, H. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **42**, 604 (1939).
202. Mills, C. A., *J. Biol. Chem.*, **46**, 135, 167 (1921). Mills, C. A., and Guest, G. M., *Am. J. Physiol.*, **57**, 395 (1921).
203. Mills, C. A., Dorst, S. E., Mynchenberg, G., and Nakayama, J., *Am. J. Physiol.*, **63**, 484 (1923).
204. Milstone, H., *J. Gen. Physiol.*, **25**, 679 (1942).
205. Milstone, J. H., *Science*, **106**, 546 (1947); *J. Gen. Physiol.*, **31**, 301 (1948).
- 205a. Milstone, J. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **68**, 225 (1948).
206. Minot, G. R., *Am. J. Physiol.*, **39**, 131 (1915).
207. Mommaerts, W. F. H. M., *J. Gen. Physiol.*, **29**, 103, 113 (1946).
208. Monkhouse, F. C., Stewart, M., and Jaques, L. B., *Federation Proc.*, **8**, 112 (1949).
209. Morawitz, P., *Ergeb. Physiol.*, **4**, 307 (1905).
210. Morrison, P. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2723 (1947).
211. Morrison, P. R., Edsall, J. T., and Miller, S. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3103 (1948).
212. Munro, F. L., Hart, E. R., Munro, M. P., and Walking, A. A., *Am. J. Physiol.*, **145**, 206 (1945). Munro, F. L., and Munro, M. P., *Am. J. Physiol.*, **149**, 95 (1947); **150**, 409 (1947).
213. Munro, F. L., and Munro, M. P., *Arch. Biochem.*, **15**, 295 (1947).
214. Murphy, R. C., Ware, A. G., and Seegers, W. H., *Am. J. Physiol.*, **151**, 338 (1947). Fahey, J. L., Ware, A. G., and Seegers, W. H., *Am. J. Physiol.*, **154**, 122 (1948); *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **69**, 216 (1948). Murphy, R. C., and Seegers, W. H., *Am. J. Physiol.*, **154**, 134 (1948).
215. Mylon, E., Winternitz, M. C., and de Sütö-Nagy, G. J., *J. Biol. Chem.*, **143**, 21 (1942).
216. Nanninga, L. B., *Arch. néerl. physiol.*, **28**, 241 (1946).
217. Nanninga, L. B., *Investigations on Fibrinogen and Thrombin; the Second Phase of Blood Coagulation*, Amsterdam, 1947.

218. Nielsen, P. H., *Nord. Med.*, **20**, 2205 (1943).
219. Nolf, P., *Ergeb. inn. Med. u. Kinderheilk.*, **10**, 275 (1913); *Medicine*, **17**, 381 (1938).
220. Nolf, P., *Arch. intern. Physiol.*, **16**, 374 (1921); **18**, 549 (1921). *Arch. intern. Pharmacodynamie*, **70**, 323 (1945); **71**, 1 (1945).
221. Nolf, P., *Compt. rend. soc. biol.*, **84**, 273 (1921); *Le sang*, **10**, 257 (1936); *Medicine*, **17**, 381 (1938).
222. Nolf, P., *Schweiz. med. Wochschr.*, **71**, 253 (1941).
223. Nolf, P., *Arch. intern. pharmacodynamie*, **70**, 5 (1945).
224. Nolf, P., *Schweiz. med. Wochschr.*, **75**, 78, 110 (1945).
225. Nolf, P., *Arch. intern. Physiol.*, **56**, 185 (1948).
226. Nolf, P., *Arch. intern. Physiol.*, **60**, 288 (1948); *Le sang*, **19**, 321 (1948).
227. Nordbø, R., *Skand. Arch. Physiol.*, **75**, Suppl. No. 11 (1936).
228. Onley, J. L., Melin, M., Richert, D. A., Cameron, J. W., and Gross, P. M., Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 541 (1949).
229. O'Neal, W. J., and Lam, C. R., *Am. J. Med. Sci.*, **210**, 181 (1945).
230. Owen, C. A., Jr., and Bollman, J. L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **67**, 231 (1948).
231. Owen, C. A., Jr., and Bollman, J. L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **67**, 367 (1948).
232. Owren, P. A., *Aarbok Norske Videnskaps-Akad.*, **1944**, 21; *Nord. Med.*, **28**, 2630 (1945); *Lancet*, **1**, 446 (1947).
233. Owren, P. A., *The Coagulation of Blood. Investigations on a New Clotting Factor*, Oslo, 1947; also *Acta Med. Scand.*, Suppl. No. 194, 1947.
234. Owren, P. A., *Biochem. J.*, **43**, 136 (1948).
235. Page, R. C., and Russell, H. K., *J. Lab. Clin. Med.*, **26**, 1366 (1941).
236. Pálos, L. A., *Schweiz. med. Wochschr.*, **78**, 112 (1948); *Experientia*, **5**, 207 (1949); *Proc. Soc. Exptl. Med.*, **71**, 471 (1949).
237. Parfentjev, A., *Am. J. Med. Sci.*, **202**, 578 (1941). Taylor, F. H. L., Lozner, E. L., and Adams, M. A., *Am. J. Med. Sci.*, **202**, 585 (1941).
238. Patton, T. B., Ware, A. G., and Seegers, W. H., *Blood*, **3**, 656 (1948).
239. Permin, P. M., *Fibrinolytiske Enzymer*. Thesis, Copenhagen, 1949.
240. Piper, J., *Acta Physiol. Scand.*, **9**, 28 (1945); *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **2**, 317 (1946). Astrup, T., and Piper, J., *Acta Physiol. Scand.*, **9**, 351 (1945).
241. Piper, J., *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **2**, 138 (1946).
242. Piper, J., *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **3**, 373 (1947).
243. Quick, A. J., *Am. J. Physiol.*, **114**, 282 (1935).
244. Quick, A. J., *Am. J. Physiol.*, **131**, 455 (1940); *Science*, **106**, 591 (1947).
245. Quick, A. J., *Am. J. Med. Sci.*, **201**, 469 (1941).
246. Quick, A. J., *Am. J. Physiol.*, **140**, 212 (1943).
247. Quick, A. J., *Am. J. Clin. Path.*, **15**, 560 (1945).
248. Quick, A. J., *Proc. Inst. Med. Chicago*, **16**, No. 3 (1946).
249. Quick, A. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **62**, 249 (1946).
250. Quick, A. J., *Am. J. Med. Sci.*, **214**, 272 (1947).
251. Quick, A. J., *Am. J. Physiol.*, **148**, 211 (1947). Stefanini, M., and Quick, A. J., *Am. J. Physiol.*, **152**, 389 (1948).
252. Quick, A. J., *Am. J. Physiol.*, **151**, 63 (1947).
253. Quick, A. J., *Lancet*, **2**, 379 (1947).
254. Quick, A. J., Stanley-Brown, M., and Bancroft, F. W., *Am. J. Med. Sci.*, **190**, 501 (1935).
255. Quick, A. J., and Stefanini, M., *J. Gen. Physiol.*, **32**, 191 (1948).
256. Quick, A. J., and Stefanini, M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **67**, 111 (1948).
257. Quivy, D., Thesis, University of Paris, 1945. Bertrand, I., and Quivy, D.,

- Compt. rend. soc. biol.*, **138**, 304, 404, 434, 790 (1944); **139**, 761 (1944); **142**, 1402 (1948); *Bull. soc. chim. biol.*, **28**, 178 (1946).
258. Randall, A., and Randall, J. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **70**, 215 (1949).
259. Ransmeier, J. C., and McLean, F. C., *Am. J. Physiol.*, **121**, 488 (1938).
260. Rapoport, S., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **64**, 478 (1947).
261. Reichel, C., *Klin. Wochschr.*, **21**, 862 (1942); *Z. Kinderheilk.*, **63**, 613 (1943).
262. Reichel, C., *Z. physiol. Chem.*, **280**, 32 (1944).
263. Rieben, W. K., *Beiträge zur Kenntnis der Blutgerinnung*, Schwabe, Basel, 1947; *Bull. soc. chim. biol.*, **29**, 111 (1947).
264. Rigdon, R. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **50**, 324 (1942).
265. Robbins, K. C., *Arch. Biochem.*, **6**, 69 (1945).
266. Roberts, A. C., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **32**, 606 (1935).
267. Rocha e Silva, M., Beraldo, W. T., and Rosenfeld, G., *Am. J. Physiol.*, **156**, 261 (1949).
268. Rosenfield, R. E., and Tuft, H. S., *Arch. Biochem.*, **16**, 329 (1948).
269. Scheuring, H., *Biochem. Z.*, **291**, 385 (1937).
270. Schloessmann, H., *Beiträge klin. Chir. (Bruns)*, **79**, 503 (1912).
271. Schneider, C. L., *Am. J. Physiol.*, **147**, 255 (1946); **149**, 123 (1947).
272. Seegers, W. H., *J. Biol. Chem.*, **136**, 103 (1940).
273. Seegers, W. H., *Arch. Biochem.*, **3**, 363 (1944).
274. Seegers, W. H., *J. Phys. & Colloid Chem.*, **51**, 198 (1947).
275. Seegers, W. H., in *Blood Clotting and Allied Problems*. Transactions of the First Conference, Josiah Macy, Jr., Foundation, New York, p. 64.
276. Seegers, W. H., and Doub, L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **56**, 72 (1944).
277. Seegers, W. H., Loomis, E. C., and Vandenbelt, J. M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **56**, 70 (1944).
278. Seegers, W. H., Loomis, E. C., and Vandenbelt, J. M., *Arch. Biochem.*, **6**, 85 (1945).
279. Seegers, W. H., and Loomis, E. C., *Science*, **104**, 461 (1946).
280. Seegers, W. H., Nieft, M., and Loomis, E. C., *Science*, **101**, 520 (1945).
281. Seegers, W. H., Nieft, M., and Vandenbelt, J. M., *Arch. Biochem.*, **7**, 15 (1945).
282. Seegers, W. H., and Sharp, E. A., *Hemostatic Agents*. C. C. Thomas, Springfield, 1948.
283. Seegers, W. H., and Smith, H. P., *J. Biol. Chem.*, **140**, 677 (1941).
284. Seegers, W. H., and Smith, H. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **52**, 159 (1943).
285. Seegers, W. H., and Ware, A. G., *Federation Proc.*, **7**, 186 (1948).
286. Smith, H. P., Warner, E. D., and Brinkhous, K. M., *Am. J. Physiol.*, **107**, 63 (1934).
287. Snellman, O., Jensen, R., and Sylvén, B., *Nature*, **161**, 639 (1948).
288. Stefanini, M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **67**, 22 (1948).
289. Steinberg, A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **56**, 124 (1944).
290. Studer, A., in *Festschrift Emil Barell*, 1946, p. 229, Hoffmann-La Roche, Basel.
291. Sykes, E. M., Seegers, W. H., and Ware, A. G., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **67**, 506 (1948).
292. Szecsenyi-Nagy, L., *Biochem. Z.*, **317**, 185 (1944).
293. Tagnon, H. J., and Soulier, J. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **61**, 440 (1946).
294. Thordarson, O., *Nature*, **145**, 305 (1940); *Acta Med. Scand.*, **104**, 291 (1940). Thordarson, O., Begtrup, H., and From-Hansen, P., *Acta Med. Scand.*, **113**, 459 (1943).

295. Tocantins, L. M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **49**, 251 (1942).
296. Tocantins, L. M., *Am. J. Physiol.*, **139**, 265 (1943); *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **54**, 94 (1943); **55**, 291 (1944). Tocantins, L. M., Carroll, R. T., and McBride, T. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **68**, 110 (1948). Tocantins, L. M., and Carroll, R. T., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **69**, 431 (1948).
297. Tocantins, L. M., and Lindquist, J. N., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **65**, 44 (1947).
298. Vincke, E., *Z. physiol. Chem.*, **272**, 65 (1941). Vincke, E., and Schmidt, E., *Z. physiol. Chem.*, **273**, 39 (1942).
299. Volkert, M., *Biochem. Z.*, **309**, 337 (1941); **314**, 34 (1943); *Acta Physiol. Scand.*, **5**, 365 (1943); *Acta Chir. Scand.*, **89**, 379 (1943). Volkert, M., and Hertel, E., *Ugeskrift Laeger*, **105**, 782 (1943). Volkert, M., and Piper, J., *Acta Chir. Scand.*, **89**, 417 (1943).
300. Volkert, M., *Antithrombin Content of the Blood and Its Relation to Heparin*. Copenhagen, 1942; also *Acta Physiol. Scand.*, **5**, Suppl. No. 15 (1942).
301. Ware, A. G., Fahy, J. L., and Seegers, W. H., *Am. J. Physiol.*, **154**, 140 (1948).
302. Ware, A. G., Guest, M. M., and Seegers, W. H., *Am. J. Physiol.*, **150**, 58 (1947).
303. Ware, A. G., Guest, M. M., and Seegers, W. H., *Arch. Biochem.*, **13**, 231 (1947).
304. Ware, A. G., Guest, M. M., and Seegers, W. H., *J. Biol. Chem.*, **169**, 231 (1947); *Science*, **106**, 41 (1947).
305. Ware, A. G., Murphy, R. C., and Seegers, W. H., *Science*, **106**, 618 (1947).
306. Ware, A. G., and Seegers, W. H., *J. Biol. Chem.*, **172**, 699 (1948); *Am. J. Physiol.*, **152**, 567 (1948).
307. Ware, A. G., and Seegers, W. H., *J. Biol. Chem.*, **174**, 565 (1948).
308. Warner, E. D., Brinkhous, K. M., and Smith, H. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **40**, 197 (1939); *Am. J. Physiol.*, **125**, 296 (1939). Ziffren, S. E., Owen, C. A., Hoffman, G. R., and Smith, H. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **40**, 595 (1939). Owen, C. A., Hoffman, G. R., Ziffren, S. E., and Smith, H. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **41**, 181 (1939). Seegers, W. H., Brinkhous, K. M., Smith, H. P., and Warner, E. D., *J. Biol. Chem.*, **126**, 91 (1938).
309. Weitnauer, H., Grüning, W., and Wöhlisch, E., *Biochem. Z.*, **307**, 325 (1941).
310. Wiame, J. M., *Compt. rend. soc. biol.*, **140**, 897 (1946); *Biochim. et Biophys. Acta*, **1**, 234 (1947).
311. Widenbauer, F., *Deut. med. Wochschr.*, **68**, 1243 (1942).
312. Widenbauer, F., and Reichel, C., *Biochem. Z.*, **309**, 100, 415 (1941).
313. Widenbauer, F., and Reichel, C., *Biochem. Z.*, **311**, 307 (1942); *Klin. Wochschr.*, **20**, 1129 (1941); **21**, 436, 524, 1081 (1942).
314. Wiemer, K., *Monatschr. Kinderheilk.*, **42**, 496 (1929).
315. Wilander, O., *Skand. Arch. Physiol.*, **81**, Suppl. No. 15 (1938).
316. Wilson, S. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **43**, 676 (1940); *Arch. Intern. Med.*, **69**, 647 (1942).
317. Wilson, S. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **66**, 126 (1947).
318. Witts, L. J., and Hobson, F. C. G., *Brit. Med. J.*, **2**, 862 (1940); *J. Path. Bact.*, **52**, 367 (1941).
319. Wöhlisch, E., *Ergeb. Physiol.*, **28**, 443 (1929).
320. Wöhlisch, E., *Ergeb. Physiol.*, **43**, 174 (1940).
321. Wöhlisch, E., *Biochem. Z.*, **309**, 238 (1941).
322. Wöhlisch, E., and Grüning, W., *Biochem. Z.*, **305**, 183 (1940).

323. Wolfrom, M. L., Karabinos, J. V., Smith, C. S., Ohliger, P. H., Lee, J., and Keller, O., *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 1624 (1945). Risser, W. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 341 (1946).
324. Wolfrom, M. L., and Rice, F. A. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2918 (1947).
325. Wolfrom, M. L., Weisblat, D. I., Karabinos, J. V., McNeely, W. H., and McLean, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 2077 (1943).
326. Wunderly, C., in *Medicine et Biologie*, No. 5, *Un symposium sur les protéines*. Masson, Paris, 1947, p. 179.
327. Wunderly, C., *Nature*, **163**, 217 (1949).
328. Zunz, F., *Compt. rend. soc. biol.*, **118**, 185 (1935).

TRYPTOPHANASE-TRYPTOPHAN REACTION

By FRANK C. HAPPOLD, *Leeds, England*

CONTENTS

I. Introduction	51
II. Early Studies on Mode of Formation of Indole	55
A. Introductory Studies on Mechanism	55
B. Nature of the Cell-Free Enzyme	60
C. Further Studies on Mechanism	62
III. Preparation and Properties of the Cell-Free Enzyme	65
A. Michaelis Constant	65
B. Effect of pH	66
C. Effect of Enzyme Concentration	66
D. Heat of Activation of Tryptophan → Indole Reaction in Presence of Tryptophanase	66
IV. Metal Catalysis of Indole Production	68
V. Inhibitors	69
Effect of Various Cations	70
VI. Indole and the Synthesis of Tryptophan	71
VII. Inhibition of Indole Production in Culture by Fermentable Carbohydrate	74
Specific Inhibition of Indole Production by <i>Escherichia coli</i> in Presence of Phenylalanine or Tyrosine and Glucose in Simple Media	77
References	81

I. Introduction

According to Kühne (39) it was Claude Bernard who first noticed the beautiful red color which was obtained when pancreatic extracts were treated with nitric acid and about the same time, Baeyer, who obtaining indole by distillation from similar preparations, regarded this color as characteristic of indole. Nencki (47) noticed indole among the derivatives from the action of pancreatic extracts upon casein. Kühne showed that this was due to the putrefaction occurring and not to the action of the pancreatic enzymes; he regarded indole as a breakdown product of albumin. All these workers were very conscious of the fecal smell of their preparations. Indole and indoleacetic acid were isolated by Salkowski and Salkowski (53).

Hopkins and Cole (36) studied the action of *Escherichia coli* on

tryptophan which they had recently isolated. The result of aerobic breakdown was the production of indole and indoleacetic acid; anaerobically indolepropionic acid, but no indole or indoleacetic acid, was formed. Herzfeld (33) obtained a 60% yield of indole by boiling tryptophan in the presence of copper sulfate and 9% (w/v) sodium hydroxide, and Herzfeld and Klinger (34) proved a rough stoichiometric relationship between the indole formed and tryptophan metabolized by bacterial action.

Friber (26) showed that the color test used by Salkowski was not specific for indole and found no production of indole by many strains of microorganisms which had been reported indole positive. He re-examined the color reactions then in use, commented on the fact that all researchers found the Ehrlich reaction the best, *i.e.*, the most specific, but noted that the Salkowski reaction was the cheaper. Those who preceded him were concerned not with the mechanism of indole production but the differentiation of bacterial types. Friber (26) and Neisser (46) claimed that those organisms which did not produce indole from tryptophan under aerobic conditions formed indoleacetic acid which they regarded as an intermediate in indole formation and that indole formers also, in the presence of fermentable carbohydrate, caused the oxidation of the tryptophan only to this intermediate stage. Friber (26), in growth experiments, failed to obtain indole from 3-indolecarboxylic, 3-indoleacetic, and indole-2,3-dicarboxylic acids, β -3-indolepyruvic acid, and β -3-indoleethylamine, but their mechanism for indole formation still appears in respectable textbooks of biochemistry though its foundations were completely destroyed by Woods (65) and almost simultaneously by Happold and Hoyle (28). Saito (52) found some indole formation when *Escherichia coli* grew with *dl*- β -3-indoleacetic and β -3-indolepyruvic acids in the presence of an alternative nitrogen source.

This latter was in contradistinction to Friber who found no indole from indolepyruvate in the presence of ammonium lactate but it is well to remember that asparagine and ammonium lactate were present in Saito's medium which might have aided transamination, in a pyruvate-aspartic coupled reaction.

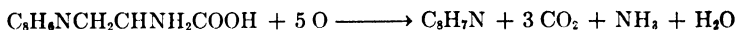
Raistrick (50) (quoted by Cole) suggested that the primary reaction in both the aerobic and anaerobic breakdowns of amino acids by bacteria is a deamination to the unsaturated acrylic acid. This suggestion derives from the isolation of urocanic acid as a product of

histidine metabolism. This promising hypothesis had to be discarded when both Woods (66) and Happold and Hoyle (28) showed that neither in growth experiments nor with tryptophanase preparations could this type of compound give rise to indole. Woods had shown there was no formation of indole from indole-3-aldehyde, indole-3-carboxylic acid, indole-3-acetic acid, β -3-indolepropionic acid, and β -3-indoleacrylic acid; β -3-indolepyruvic acid gave 10% production of indole when washed suspensions were aerated in the presence of this compound and ammonia. Woods clearly visualized this as dependent upon the amination of the pyruvate to the amino acid.

Happold and Hoyle obtained similar results with their nonviable enzyme preparation. Thus the position in 1935 was that the old theories for indole production from tryptophan had been disproved but no new hypothesis had been propounded.

Before proceeding further it is well to consider the differences in technique adopted by Woods and the Leeds workers, respectively. The former used washed viable suspensions. Indole was determined by Bergeim's (7) modification of the method of Herter and Foster (32), a method which gave results with an accuracy of 97-98% in concentrations between 1 and 0.1 mg. The curves show optimum indole production occurring in 20-36 hours.

When oxygen uptake, carbon dioxide evolution, and indole production were studied concurrently in Barcroft manometers, Woods found that only a 40% conversion could be obtained (had his method of determining indole been more sensitive and smaller amounts of tryptophan used, the indole formation would have approximated much more closely to the theoretical yield). He was able to establish the over-all equation of the reaction:



He found an oxygen uptake of 472 $\mu\text{l. O}_2/\text{mg. indole formed}$ (5 atoms of O_2 require 475 $\mu\text{l. O}_2/\text{mg. indole}$). The results are in good agreement with the theoretical requirements.

Woods also studied the effect of certain inhibitors upon his reaction and reported that toluene, chloroform, acetone, and cyclohexanol completely inhibited the reaction. He seems to have followed this effect by measuring oxygen absorptions solely; had he followed the indole production throughout he might have anticipated valuable later findings. His method for determining indole was, however,

laborious and perhaps not sufficiently sensitive for the immediate problem and this doubtless influenced the pattern of his method.

The Leeds workers' first objective was to obtain nonviable enzyme preparations—they were handicapped or blessed by having at the time no microrespirometers to work with and indeed their work sprang from their development of an entirely new technique for determining indole based on the rapid development of rosindole when the indole reacts with a sufficiency, but not an excess, of Ehrlich's *p*-dimethylaminobenzaldehyde reagent (27).†

The principle of the method adopted was to extract the indole from the culture or reactant mixture by a solvent immiscible with water or with the Ehrlich reagent. Light petroleum (b.p. 40–60°), toluene, and xylene fulfilled these requirements, but the former was much easier to handle than the two latter. It was found that with cultures an equal volume of light petroleum removed about 90% of the indole present so that two successive extractions removed practically the whole of the indole. Moreover, if Ehrlich's reagent was added stepwise in 5-ml. aliquots first to the second of the two light petroleum extracts, one could rapidly tell if the indole present was so excessive as to warrant a third extraction of the original reactant mixture. Extraction of the petroleum layer was continued with Ehrlich's reagent until no more rosindole was formed and the summated fractions were compared against standard indole solutions similarly treated.*

Happold and Hoyle (28) made their enzyme preparations using toluene, chloroform, and acetone as agents toxic to the living cell. They showed that the composition of the media affected the production of tryptophanase within the organism; a free oxygen supply was essential, any restriction in the latter reduced tryptophanase development. They did not know that the indole formation could be catalyzed without oxygen uptake since they were only able to follow indole and ammonia formation. The most effective preparations were obtained when the organism was grown on 1:10,000 tryptophan solidified with agar (*pH* 7.8) and with no other sources of carbon and nitrogen. The total bulk of enzyme obtained was poor though the ratio of potency to protein content was higher with this medium than with any other. For most purposes a tryptic digest of casein was used as a basis for the solid medium employed in the preparation of the enzyme.

The observations made by Fischer (25) and by succeeding generations of bacteriologists that indole production by microorganisms is inhibited by the presence of glucose in the culture medium was shown

† It is notable that a standard work on colorimetric methods, Snell and Snell (57), mentions our paper among a number of others and then ascribes our detailed method to Macchia (42).

* If the amount of indole is of the order of 1 part in 500,000 the reagent is added in 1-ml. portions at a time; 1 μ g. indole can be fairly accurately determined. In the author's hands more accurate determinations have been obtained and to a lower concentration with Klett colorimeters than with the Spekker photoelectric absorptiometer.

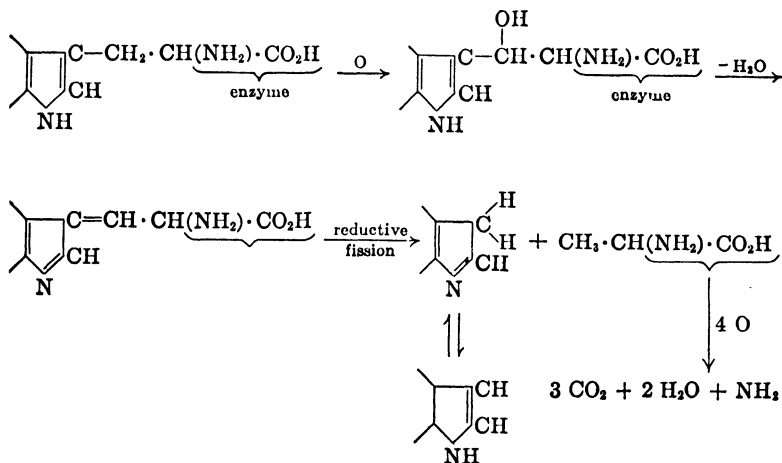
to be due to failure of enzyme formation, an observation which will be more fully developed later.

II. Early Studies on Mode of Formation of Indole

A. INTRODUCTORY STUDIES ON MECHANISM

Baker and Happold (3) prepared and examined a large number of new derivatives and, from their results and those of Frieber, Woods, and Happold and Hoyle, stated that the integrity of both the α -amino and carboxylic groups in the tryptophan side chain is essential to this enzymic breakdown. The experimental exclusion of indole-3-carboxylic acid as the penultimate stage in the production of indole suggested that such production might result from the elimination of the alanine side chain as a whole since the lower homologue of tryptophan, *r*-3-indolylglycine, did not give indole; these workers felt that the breakdown mechanism might involve the β carbon atom of the side chain.

The presence of a suitable oxygen substituent at this β carbon renders possible prototropic change in the indole ring with consequent conversion into the indolydene structure; a parallel reductase system might give indole by the direct reductive fission of this indolydene compound. The scheme of breakdown tentatively suggested is shown in I. It is to be noted that β -3-indolylserine is the first suggested intermediate in the reaction.



In 1939, Stephenson (59) suggested a hypothesis which was developed by Krebs, Hafez, and Eggleston (38), *viz.*, that β -*o*-aminophenylacetaldehyde was the effective indole-producing intermediate in the breakdown of tryptophan to indole. This they developed from the work of Stephens (58) and of Bennett and Hafez (6) who had shown that β -*o*-aminophenylacetaldehyde or β -*o*-aminophenylethanol readily formed indole *in vitro* and also from the knowledge that in the metabolism of tryptophan in the rabbit or by *Bacillus subtilis*; tryptophan is converted into kynurenine. They therefore assumed that the conversion of tryptophan into indole might start with an oxidation of the ring leading *via* oxindolealanine to an *o*-anilino derivative similar to kynurenine, and that the side chain might be broken down to β -*o*-aminophenylacetaldehyde which would give rise to indole. It is a pity that the text of this paper contains the statement:

“...at the optimum concentration the rate of indole formation from *o*-amino- β -phenylethanol is more than 3 times higher than that from tryptophan”

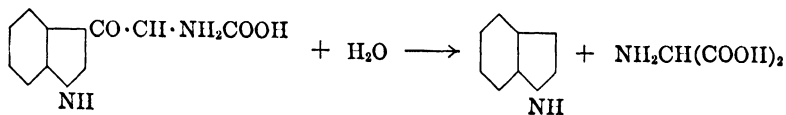
since their findings do not justify this simplification which has been repeated in the recent edition of Stephenson's *Bacterial Metabolism*. It is obvious from their figures that their tryptophanase was saturated in the presence of about 1.2 mg. of tryptophan and that over 50% of the theoretical amount of indole was produced using β -*o*-aminophenylethanol. Only a 7.3% conversion occurred, and the optimum concentration was about 20 mg. of substrate. The *Escherichia coli* cells were grown for 5 days at 37°C. in these experiments.

Baker, Happold, and Walker (4) repeated the work of Krebs *et al.* and their findings can be summarized as follows: Washed cells which yielded 90% of the theoretical indole formation from tryptophan in 1–2 hours sometimes, but not always, produced indole from β -*o*-aminophenylethanol—the highest yields represented only a 22% conversion after 18 hours' incubation; there was every evidence that a period of adaptation was necessary before indole was produced from this substrate and that the enzyme system concerned was not tryptophanase. Further evidence of enzymic adaptation was obtained using cells grown in the presence of tryptophan or β -*o*-aminophenylethanol, respectively. The results showed the greater tryptophanase activity of the former cells and the fact that the latter first produce indole from β -*o*-aminophenylethanol.

Krebs and his associates recognized that the production of indole from β -*o*-aminophenylethanol *via* its oxidative product, the corresponding aldehyde, did not necessarily prove this latter compound was an intermediate in the degradation of tryptophan but "they preferred" to make this assumption which the Leeds workers felt unwarranted especially when dimedon (5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione) was shown to inhibit indole formation completely from β -*o*-aminophenylethanol (confirming that the aldehyde is the intermediate in the production of indole from this substrate) but was without effect upon the indole production from tryptophan. This mechanism, which involves a fission of the indole nucleus of the tryptophan molecule and its subsequent reformation, cannot be maintained.

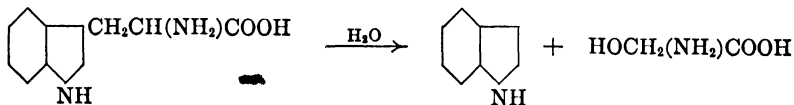
Baker and Happold (3) in their hypothesis involving the fission of the indolylidene structure had pointed out that the preliminary prototropic change involving the hydrogen atom in the 1 position of the indole nucleus would not be possible if this hydrogen were replaced by an alkyl group. Accordingly, α -amino- β -(1-methylindolyl-3)-propionic acid was now prepared and tested with tryptophanase. *N*-methylindole was not produced. This finding prescribed a fourth essential structural condition for the enzymic degradation in addition to the three previously recorded, *i.e.*, the presence of an unsubstituted NH group in the indole nucleus of tryptophan. With the assistance of Dr. F. W. Chattaway, ethyl- α -bromo- β -keto- β -3-indolylpropionate was synthesized and treatment of this with cold methanolic ammonia gave a product (not yet isolated pure) which with the enzyme system gave a slight qualitative reaction for indole. Further attempts in this direction were negative.

An alternative mechanism to the reductive fission of the indolylidene derivative would be a hydrolytic fission of the β -keto compound:



Aminomalonic acid was, however, quite inert to tryptophanase and, moreover, it is difficult to see why the alkylation of the indole nitrogen should inhibit enzyme action if this mechanism were correct.

A promising hypothesis was suggested by Tatum and Bonner (61); they found that a mutant of *Neurospora crassa* which required tryptophan for growth could utilize indole and L(-)serine in place of the amino acid and they regarded the degradation of tryptophan to indole by *Escherichia coli* as a reversal of the reaction found in *Neurospora*. In support of this theory:



they showed that some inhibition of indole production followed the addition of serine to tryptophan; they also claimed the synthesis of tryptophan from indole and serine both by the *Neurospora* strain and by *E. coli*. Experimental details and quantitative results were not given at this time.

Happold and Hoyle (29) had already shown that *E. coli* growing in a tryptophan-free synthetic medium could utilize indole in the metabolism of the cell and both the theories of Baker and Happold and Tatum and Bonner might fit the results. Dawes, Dawson, and Happold (11,12) examined the effect of serine and alanine on indole production from tryptophan and sought again for intermediates in the direct tryptophan \rightarrow indole reaction.

Bonner and Tatum in support of their hypothesis explained the inhibitory action of serine on indole formation as a simple mass action effect. Dawes, Dawson, and Happold showed that there is no such simple relationship between tryptophan and serine concentrations but that the inhibitory effect depends on the saturation of tryptophanase with tryptophan. When the enzyme was not fully saturated with tryptophan, serine exerted no inhibitory action. Similar results were obtained with alanine though the inhibition when present was less well marked than with serine. When the enzyme was not fully saturated, serine sometimes appeared to stimulate indole production. This relationship is the inverse of that usually noted. In these experiments of Bonner and Tatum viable cells and not enzyme preparations were used and the results are susceptible to the explanation advanced by Bonner and Tatum. There is, however, an alternative explanation. Indole formation in the living organism is dependent upon the continual reoxidation of the carrier system of the trypto-

phanase complex (indole could be produced in anaerobic culture by electron transfer). Since alanine and serine, which cause inhibition, are preferentially oxidized by tryptophan-adapted cells, while other amino acids which do not inhibit are not, a possible explanation would therefore be an insufficiency of oxygen to complete the reoxidation of the carrier systems for both sets of reactions. All attempts by Dawes, Dawson, and Happold to demonstrate indole utilization in the presence of serine in growth experiments over 7-day periods have failed. While this work was in progress Fildes (23), using suspensions of *Escherichia coli* and *Eberthella typhosa*, reported failure to demonstrate either the utilization of indole in the presence of serine or any production of tryptophan. However, Umbreit, Wood, and Gunsalus (63) prepared an enzyme which catalyzed the synthesis of tryptophan from indole and serine using the Bonner-Tatum strain of *Neurospora*. This enzyme required pyridoxal phosphate as coenzyme. Since they later prepared a cell-free tryptophanase from *E. coli* and have not identified the one with the other we must assume that their *Neurospora* enzyme was devoid of tryptophanase activity.

In either of these hypotheses fission is represented as occurring between C_β of an intact C_α side chain and the 3 position of the indole nucleus as first suggested by Baker and Happold, though some metabolism of the side chain might occur by intramolecular hydrogen transfer.

Dawson (16) had shown that washed viable suspensions of *E. coli* when incubated with tryptophan in the presence of mepacrine (atabrine) showed a diminished rate of indole production and an absence of oxygen uptake over a period of 60 minutes. Dawes, Dawson, and Happold (12), therefore, analyzed coli-mepacrine-tryptophan systems after 55 minutes' incubation by the partition chromatographic method of Consden, Gordon, and Martin (8). Their results can be summarized:

Solvent (saturated with water)	Alanine present (experiments)	No indication of alanine (experiments)
<i>p</i> -Cresol.....	5	3
<i>n</i> -Butanol-benzyl alcohol.....	8	2
<i>n</i> -Butanol.....	1	1
Serine was always absent		

Moreover, the density of the color reaction for alanine, developed with ninhydrin, was consistent with the concentrations expected from the concurrent liberation of indole determined in the majority of experiments performed. These results supported the hypothesis of Baker and Happold though the authors reported their failure to detect alanine in any experiments with the free enzyme preparations.

B. NATURE OF THE CELL-FREE ENZYME

In the earliest preparations, Happold and Hoyle (28), 16-hour cultures of the organism were freed from indole and media by centrifugation and the deposited cells suspended in saline. Chloroform was added in the proportions of 1 volume of chloroform to 2 volumes of suspension and the mixture was shaken at 200 r.p.m. in a mechanical shaker. A quite sterile milky emulsion resulted, which was active as a tryptophanase preparation. Stable preparations were prepared by precipitating washed cells with 66% alcohol (at 0°C.) and then washing with ice-cold absolute alcohol, alcohol-ether (1:2), and ether, followed by desiccation *in vacuo*.

In these earlier studies the pH range for enzymic activity was between pH 5.0 and 10.0 with an optimum at pH 8.5, but later work with free enzyme gave a lower optimum of pH 7.5. Sodium deoxycholate 1:1000 accelerated the production of indole by freshly isolated strains of *Escherichia coli*; this was not due to any direct action on the enzyme since such concentrations inhibited free enzyme action.

Dawes, Dawson, and Happold (11) and Dawes and Happold (14) have prepared cell-free tryptophanase by pouring washed suspensions at 0°C. into 5 volumes of acetone with constant stirring. The flocculated cells were allowed to settle and then filtered off in a Buchner funnel, washed successively with acetone, acetone and ether, and, finally, ether, and dried in a desiccator. Various extraction methods were tried; extraction with 1.6 M potassium chloride at 37°C. overnight gave optimal conditions for the preparation of the enzyme. In the former of these two papers the separation of the enzyme into an apoenzyme and a coenzyme fraction was shown. In measuring the efficiency of the extraction process the activity is expressed as micrograms of indole produced per milligrams dry weight of enzyme per 30 minutes with excess of substrate. Potassium chloride (1.6 M) extracts about 80% of the activity present in the acetone-dry cells which themselves retain 40-50% of the activity of the original suspension.

The active dialyzate was yellowish in color and fluorescent in ultra-violet light, 0.260 μg . riboflavin/ml. was still present in the crude apoenzyme and approximately 0.115 μg ./ml. in the dialyzate.

Spectrophotometric analysis of the dialyzate, undertaken by Dr. F. Bergel, showed the presence of nicotinic acid while a spectrochemical analysis of the apoenzyme, carried out by Mr. J. Ewles, showed the presence only of iron among the metallic elements and to a concentration of 1.5 parts/1,000,000. In these earlier studies on coenzyme factors the Leeds workers concluded that pyridoxal phosphate or riboflavin tested separately could not reactivate the apoenzyme; these showed some slight activity when tested jointly; in contrast, diphosphopyridine nucleotide was markedly active and this activity was enhanced slightly by pyridoxal phosphate, and more strongly by riboflavin. All three compounds together gave a 50% increase in the activity in the presence of nucleotide and riboflavin. The assumption was made that the limiting factors in the coenzyme complex were the ones in shortest supply and that probably all three compounds played a role in the enzyme complex. These preparations absorbed oxygen in the presence of the substrate.

The absence of a normal cytochrome system in *Escherichia coli* (37), coupled with the presence of iron in the apoenzyme preparation and the inactivation of the enzyme by iron inhibitors led to an investigation of related carrier systems. Verdoperoxidase (VPO), which Agner (1) considered as a more or less modified cytochrome *a* derivative, was prepared and its action both on the production of indole by washed suspensions and by cell-free tryptophanase was studied. In both cases, but particularly with the cell-free enzyme, indole production was enhanced by the addition of VPO. Similar results were obtained with the cell-free enzyme and cytochrome *c*. These early crude enzyme extracts performed the reaction with consumption of five atoms of oxygen. The authors regarded the complex as a pyridine nucleotide-riboflavin-modified cytochrome linked system, pyridoxal phosphate perhaps acting as a carrier in the concurrent transamination reactions but certainly functioning as a hydrogen acceptor in the fission of the side chain.

Wood, Gunsalus, and Umbreit (67) studied the mechanism of indole formation using enzyme preparations from acetone or vacuum-dried cultures of *Escherichia coli*, grown under conditions of aeration. They resolved an enzyme which they purified by ammonium sulfate fractionation and which required pyridoxal phosphate for its reactivation. This enzyme produced indole, pyruvic acid, and ammonia in equimolar ratio from tryptophan without any oxygen uptake; it did

not deaminate alanine or serine; thus neither of these compounds are intermediates in the tryptophanase reaction. Indole was formed without any oxygen uptake so that the primary fission occurred without direct oxidation.

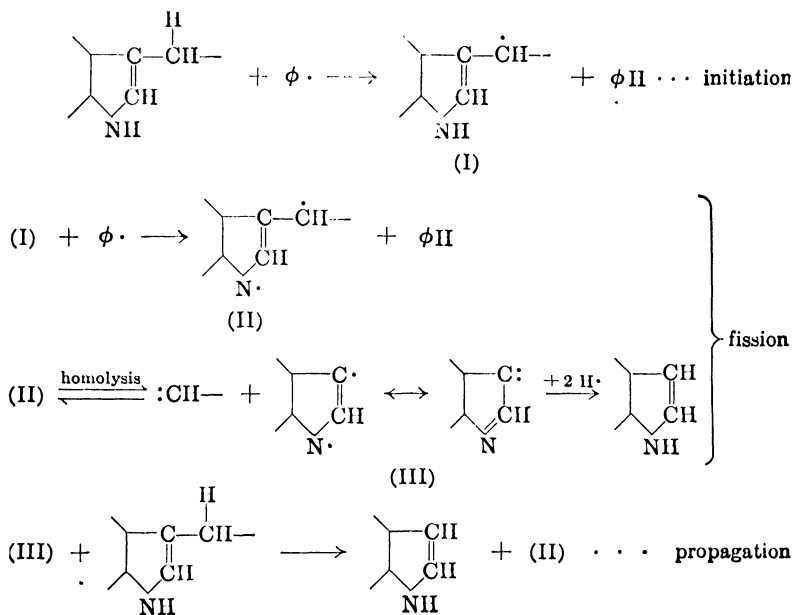
Dawes and Happold (14) also further purified their enzyme from the one which was activated by coenzyme I, riboflavin, and pyridoxal phosphate, to one only affected by the latter coenzyme. This preparation enabled them to confirm the findings of Wood *et al.*, except for one point, *i.e.*, that although their indole and pyruvate figures were in good molar agreement, the ammonia values were always in excess of 1 molar proportions, results which suggest that, with the purified enzyme system, deamination of some substrate may precede fission into indole and pyruvate. If this substrate were tryptophan itself such deamination would involve the production of indolepyruvic acid and, since this latter does not give rise to indole, a theoretical yield of indole could not be obtained, an experimentally verified fact. One thing is clear, all recent work points to a $\begin{matrix} \diagup & & \diagdown \\ & C_{\alpha} & \\ \diagdown & & \diagup \end{matrix}$ fission to give $\begin{matrix} \diagup \\ & CH \\ \diagdown \end{matrix}$ + $\begin{matrix} \diagdown \\ & CH \\ \diagup \end{matrix}$.

C. FURTHER STUDIES ON MECHANISM

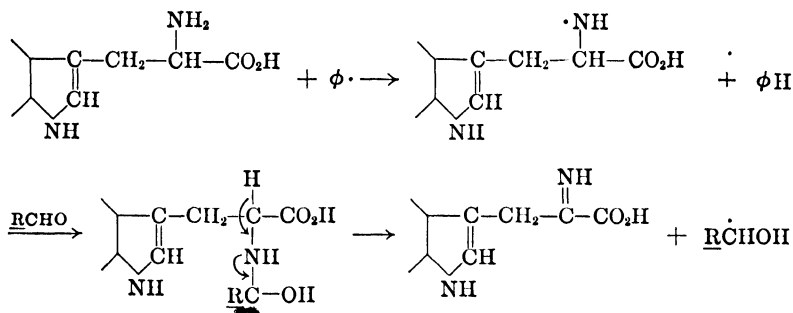
The only known mechanism for this type of rupture is *via* an initial homolytic fission to give free radicals $C\cdot + C\cdot$, stabilized by resonance. Indole can be produced from tryptophan by metal catalysis and this mechanism provides evidence that such a type of degradation may occur by mechanisms involving single electron transfers. Dr. J. W. Baker (2) has suggested a possible elaboration of the original mechanism for the enzymic fission based on enzymically produced free radical ($\phi\cdot$) initiation and with the coenzyme, pyridoxal phosphate, acting as the hydrogen acceptor. Indirect evidence supports this view of the function of pyridoxal phosphate.

Pyridoxal phosphate functions as coenzyme for amino acid decarboxylases, bacterial transaminase (*Streptococcus faecalis*), tryptophan synthesis (*Neurospora*), and tryptophanase. It has been suggested that the mode of action as coenzyme for transaminase is reversible pyridoxal-pyridoxamine conversion (56). That this interconversion is not the function for tyrosine decarboxylase and tryptophanase has been demonstrated by Umbreit, O'Kane, and Gunsalus (62) who could

not reactivate tyrosine apodecarboxylase and tryptophanase with pyridoxamine phosphate. Pyridoxamine phosphate was not active for the glutamic-aspartic transaminase apoenzyme from pig's heart. Thus the deamination of tryptophan by pyridoxal \rightarrow pyridoxamine change does not appear likely and our suggested aldehyde-alcohol interconversion, while supported by no direct evidence, violates no known experimental conditions for the enzyme reaction. The mechanism is formulated as follows where $\phi\cdot$ is the enzyme radical initiating attack on the substrate.



The large resonance stabilization of the radical (III) (for which only two of the canonical structures are depicted) would lower the energy necessary for the homolytic fission of the $\text{C}_3-\text{C}_\beta$ bond. Free radical dehydrogenation at C_α or $\alpha\text{-NH}_2$ in the side chain would yield α -imino- β -3-indolylpropionic acid, the precursor of indole and pyruvic acid fission, observed with the purified enzyme system:

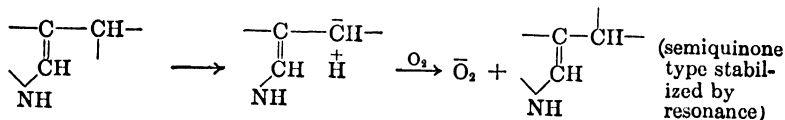


which might then undergo fission to indole by the mechanism formulated above (dehydrogenation at C_β) or, alternatively, undergo hydrolysis to ammonia and indolepyruvic acid which resists further breakdown. A combination of these reactions would explain the finding of ammonia in excess of indole and pyruvic acid by Dawes and Happold while the absence of any alkaline hydrolysis of the imino acid would explain those of Wood, Gunsalus, and Umbreit. The alanine formation which Dawes, Dawson, and Happold found in their mepacrine-inhibited system might well have come from the amination of the pyruvate formed by the tryptophanase in the whole cells used at that stage of the investigation.

Another possible mechanism for the first step has been indicated by Professor M. G. Evans who drew attention to the close analogy between the oxidation of hydroquinones to the semiquinone by the scheme:



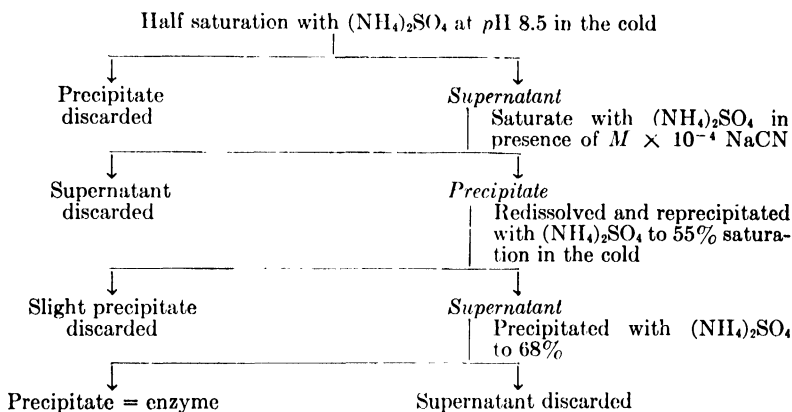
and the postulated β oxidation which might take the form:



In this case an activation energy of $\sim 18\text{--}20$ kcal. would be expected and possibly the oxidation might be effected, *in vitro*, by chelated metal complexes. This has recently been achieved with copper and cobalt compounds as indicated later.

III. Preparation and Properties of the Cell-Free Enzyme

Wood, Gunsalus, and Umbreit (67) and Dawes and Happold (14) use very similar techniques for the preparation of tryptophanase from acetone-dried cells though the latter extract with a half-saturated solution of potassium chloride instead of water, both then apply fractional precipitation with ammonium sulfate followed by adsorption onto calcium phosphate or alumina and subsequent elution. The Wood, Gunsalus, and Umbreit technique can be summarized as follows:



The enzyme is adsorbed on to calcium phosphate gel and eluted with 1 *M* phosphate buffer at pH 6.0. This enzyme and that of Dawes and Happold are both free from alanine and serine deaminases. The latter achieve a 60-fold increase in activity in the concentration and purification processes though purified preparations are less stable than the first crude preparations.

A. MICHAELIS CONSTANT

Wood *et al.* report a Michaelis constant $K_M = 2.5 \times 10^{-5}$ mole per liter (our calculations on their figures $K_M = 1.7 \times 10^{-4}$). In the preparation of Dawes and Happold, $K_M = 4.1 \times 10^{-4}$ mole per liter.

The coenzyme saturation curve of barium pyridoxal phosphate (Wood *et al.*) gave $K_M = 2.1 \times 10^{-6}$ mole per liter which they point out means that the pyridoxal phosphate complex approximates to that of the glutamic-aspartic transaminase (48), $K_M = 1.5 \times 10^{-6}$, and is higher than that of the tyrosine decarboxylase $K_M = 1.56 \times 10^{-8}$; the former are run at neutral reactions but the latter at an acid reaction.

B. EFFECT OF *pH*

The enzyme is inactive at a *pH* less than 5. Activity increases rapidly and is at an optimum at *pH* 7.5; at *pH* 10 it has approximately half the optimum activity.

C. EFFECT OF ENZYME CONCENTRATION

At low enzyme concentrations (20–50 units of activity), a linear relationship exists between enzyme concentration and the velocity of the reaction.

D. HEAT OF ACTIVATION OF TRYPTOPHAN → INDOLE REACTION
IN PRESENCE OF TRYPTOPHANASE

Happold and Morrison (30) first carried out a number of preliminary experiments at temperatures varying between 22° and 42°C. at *pH* 7.0. At 42° the rate of production was less than at 37°C. which suggests breakdown of the enzyme. With an improved technique and a more active preparation the following results were obtained at

TABLE I
EFFECT OF TEMPERATURE ON INDOLE PRODUCTION

Time, min.	Concentration of indole in $\mu\text{g.}$ (temperature, °C.)			
	0°	14.5°	27°	37°
5	—	—	7.0	25.0
10	—	3.7	15.3	27.0
15	—	—	24.5	28.6
20	—	6.4	—	30.8
25	—	—	25.4	—
30	2.0 } 2.2 }	12.8	26.0	—
40	—	16.0	—	—
50	—	17.0	—	—
60	4.4 } 4.5 }	17.0	—	—
90	— } 6.1 }	—	—	—
150	— } 8.5 }	—	—	—
180	10.0 } — }	—	—	—
240	11.0 } — }	—	—	—

temperatures of 0°, 14.5°, 27°, and 37°C. All the results were obtained within the space of one hour. There is a maximum possible error of 3-4% in the indole determinations.

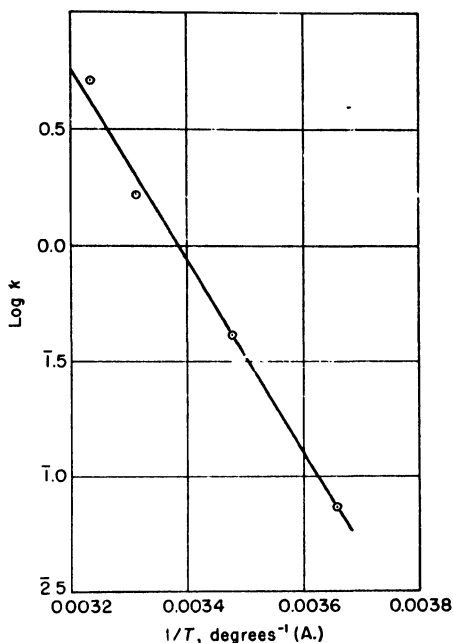


Fig. 1. Determination of heat of activation of tryptophan breakdown.

The abstracted rates (see Fig. 1), $d(\text{indole})/dt$ in $\mu\text{g.}/\text{minute}$, were as follows:

$$273^{\circ}\text{A.} = 0.07; \quad 287.5^{\circ}\text{A.} = 0.41; \quad 300^{\circ}\text{A.} = 1.60; \quad 310^{\circ}\text{A.} = 5.00$$

(this latter depends on one determination of indole)

Now:

$$\ln k = -\frac{E}{R} \times \frac{1}{T} + A$$

where k is the initial reaction velocity, A is a constant, and E is the heat of activation. Therefore, if $\log_{10} k$ is plotted against $1/T$ the slope m has the relation:

$$2.303m = -E/R$$

From the graph of $\log k$ against $1/T$:

$$m = -2.02/0.0005 = -4040$$

therefore:

$$E = 4040 \times 1.986 \times 2.303 = 18,200 \text{ cal./g. mole}$$

IV. Metal Catalysis of Indole Production

Since Baker and Happold (3) had postulated a reductive fission as the basis for the enzymic production of indole, Dawes and Happold (13) sought to discover whether it was possible to carry out this reaction chemically by hydrogenation. Mazingo, Wolf, Harris, and Folkers (44) have used this technique extensively for the hydrogenolysis of aliphatic and aromatic sulfides and disulfides and they have extended the reaction to sulfones and sulfoxides. When Raney nickel is added to L-tryptophan, dissolved in absolute alcohol with just sufficient hydrochloric acid to bring about solution, and the whole refluxed for two hours and the nickel subsequently removed, indole is produced (but alanine could not be detected by partition chromatography). Herzfeld (33), as stated, obtained a 60% yield of indole from tryptophan in the presence of copper sulfate and 9% (w/v) sodium hydroxide. Baker, Dawes, and Happold (2) have verified these results, studied the rate of the reaction, and extended the investigations to other transition metals. Some slight indole production occurs without the addition of any metal catalysts since traces of active metals are removed from the distillation flasks by the boiling alkali and these cause indole formation to occur. This soon reaches a steady rate which can be further increased by the addition of copper and cobalt salts at concentrations as low as 5×10^{-6} but not by salts of iron, manganese, nickel, chromium, tin, and cerium. Dawes and Happold (15) have shown that the products of this reaction are, as with the tryptophanase system, indole, pyruvic acid, and ammonia, and that, moreover, as occurs with their enzyme preparations, the rate of ammonia liberation is more rapid than the rate of indole production. The copper and cobalt salts also catalyze the formation of indole from β -indolyl-3-ethylamine and indolyl-3-glycine and differ in this from the enzyme system. The copper catalysis is more than twice as effective as cobalt in causing indole formation from the β -

indolyl-3-ethylamine; both are equally effective with tryptophan. Analogy with the catalytic effects of these metals in other chemical reactions suggests a single electron transfer mechanism although the presence of free radicals could not be detected by the use of methyl methacrylate monomer or luminol (*o*-aminophthalic cyclic hydrazide).

TABLE II

PRODUCTS OF COPPER AND COBALT CATALYTIC DECOMPOSITION OF TRYPTOPHAN AND β -INDOLYL-3-ETHYLAMINE

Substrate	Catalyst	Products per 10-min. sample distillate	
		Indole, μ mole	NH ₃ , μ mole
Tryptophan	Cu	0 11	0 34
	Co	0 11	0 34
β -indolyl-3-ethylamine	Cu	0 35	0 68
	Co	0 10	0.43

V. Inhibitors

Early attention was given by Evans, Handley, and Happold (20) to the effect of inhibitors of enzyme reactions upon tryptophanase, particularly in a search for the reasons for the nonproduction of the enzyme in glucose bouillon cultures. The washed cell technique was used. Sodium fluoride, $2 M \times 10^{-2}$, and sodium iodoacetate $3 M \times 10^{-2}$ did not inhibit.

The growth-inhibiting effect of mepacrine upon *Escherichia coli* (54) is known to be antagonized by riboflavin (43). Dawson (16) showed that mepacrine hydrochloride (0.1% w/v) also inhibited tryptophanase activity of washed viable cells and that added riboflavin reduced the inhibitory effect. The mepacrine effect was not permanent but extended over a period of an hour (approximately). Flavoprotein thus appeared to be a likely part of the enzyme complex. Benzamide $10^{-3} M$ produced a 50% inhibition of indole formation and this could be nullified by the addition of nicotinic acid (11). This was taken to imply the probable participation of a pyridine nucleotide in the complex. In this later communication and that of Dawes and Happold (14), cell-free enzyme preparations were used and compared with the results obtained with the washed cells, differences occurred

especially with the carbonyl reagents, hydrazine, hydroxylamine, and semicarbazide and the aldehyde reagent, dimedon. Thus, dimedon, added in alcoholic solution, inhibited the cell-free enzyme but was without effect on the viable cells. Hydrazine and hydroxylamine inhibited the cell-free enzyme completely at 10^{-2} *M* but were not quite so effective with the viable cell. Semicarbazide inhibited, but much less actively than the other two carbonyl reagents and was again less effective with the viable cell preparation than with the free enzyme. It is possible that these reagents react preferentially with some unrelated product of intermediary metabolism of the cell where washed cells are used, rather than with the coenzyme. In contrast, benzamide and mepacrine are without effect on the cell-free enzyme. These results were supporting evidence for the possible importance of pyridoxal phosphate in the tryptophanase complex. Pyridoxal phosphate had already been identified by Bellamy, Umbreit, and Gunsalus (5) as the prosthetic group of the amino acid decarboxylases and of transaminase (40).

Potassium cyanide inhibited completely at 2×10^{-2} *M* and to 80% at 4×10^{-5} *M*, both with cells and free enzyme, presumably by cyanhydrin formation with the pyridoxal phosphate. Sodium azide inhibited to 50% (10^{-2} *M*) and but slightly at 10^{-3} *M*; British antilewisite inhibited in concentrations from 10^{-1} *M* to 10^{-5} *M*. Some inhibition, using washed cells, occurs with carbon monoxide (20–25%) and with hydrogen sulfide (30%), the latter effect was reversible; with the free enzyme the inhibition was more marked and was irreversible with the hydrogen sulfide. These results suggested the possible participation of an iron or some other metal-catalyzing system within the complex. Sodium malonate (10^{-3} *M*) and sulfanilamide (2×10^{-2} *M*) were without action and Dr. E. A. Dawes has also shown that fluoroacetate is without effect on the cell-free enzyme.

EFFECT OF VARIOUS CATIONS.

The effect of various cations on the activity of cell-free tryptophanase (dialyzates from the potassium chloride extracts of acetone-dried cells) has been compared with their effect upon washed viable suspensions. The agreement between the two sets of results has been excellent. Comparisons of the inhibiting power with the precipitating power of certain of the heavier metals suggests that some of these salts might be used in the further precipitation of the apoenzyme. An

abbreviated summary of results obtained with the cell-free enzyme is appended.

NaCl and *KCl*: 60, 40, 20% and no inhibition at 2, 1, 0.2, and 0.1 molar concentrations, respectively

*CaCl*₂: complete inhibition at $2 \times 10^{-1} M$ and 42% at $2 \times 10^{-2} M$

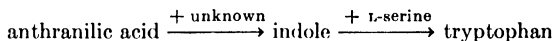
*FeCl*₃: complete inhibition at $2 \times 10^{-1} M$; 10% and no inhibition at 2×10^{-2} and $4 \times 10^{-3} M$, respectively

*CuSO*₄: complete inhibition at $2 \times 10^{-1} M$; 92, 76, 56% and no inhibition at 4×10^{-3} , 10^{-3} , 10^{-4} , and $10^{-5} M$, respectively

*HgCl*₂: complete inhibition at $2 \times 10^{-4} M$; 95 and 20% inhibition at 10^{-5} and $10^{-6} M$, respectively

VI. Indole and the Synthesis of Tryptophan

Happold and Hoyle (29) in their early studies demonstrated the utilization of indole by cultures of *Escherichia coli* and suggested its use by the organism in tryptophan synthesis. The synthesis of tryptophan from indole and serine is now well established and has been well covered in the literature. The suggested pathway appears to be:



our knowledge derives from the work of Fildes (22,23), Snell (55), Tatum and Bonner (61), and Tatum, Bonner, and Beadle (60).

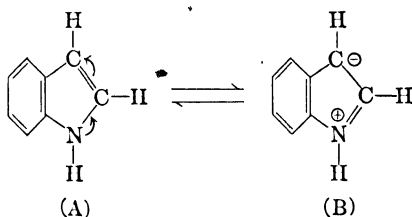
Fildes (22) using indoleacrylate as a stereoinhibitor of tryptophan synthesis in the last stage of the above reaction showed that *E. coli* and a nonexacting strain of *Eberthella typhosa* synthesized anthranilic acid as well as the above subsequent intermediates of tryptophan synthesis, but a tryptophan-exacting strain of *B. typhosum* required indole present in the basal medium.

Indoleacrylate inhibited tryptophan synthesis and hence growth of the latter organism upon a basal medium + indole, while the two former nonexacting bacteria produced indole (but not from tryptophan).

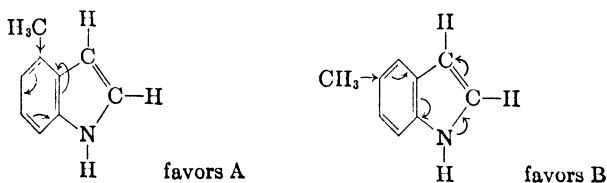
Fildes and Rydon (24) tested various methyl derivatives of indole and tryptophan in like manner as inhibitors of tryptophan and protein synthesis by *E. typhosa*. The methylindoles appear to function by competing for the enzyme system which effects the condensation of indole and serine and the order of the inhibitory effect is 4-Me > 6-Me > 7-Me > 5-Me, 1-, 2-, and 3-Me indoles have no effect. With the inhibition of protein synthesis above the tryptophan stage the

order of effect is 4-Me > 5-Me > 6-Me > 7-Me tryptophan and these findings have led them to postulate an explanation of the effect in terms of electronics.

Since 1-, 2-, and 3-Me indoles are inert it suggests that combination of indole with the enzyme involves, most closely, the pyrrole ring and any substitution in this prevents combination for stereochemical reasons. Substitution in the benzene ring does not prevent combination but affects reactivity toward the enzyme; the alternating effect observed of the inhibitory capacities of such derivatives suggests a polar effect. Indole is a resonance hybrid:

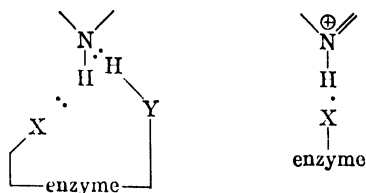


The methyl group is electron repelling and the resultant of its inductive and tautomeric effects is dependent on the position which it occupies in the benzene ring; it can result in an increased portion of A or B in the resonance hybrid. Thus the 4-Me derivative results in a localization of electrons on C₃ and this negative charge would oppose localization on adjacent C₂, thus suppressing the tendency A → B. Conversely the 5-Me derivative leads to a localization on C₂, thus facilitating A → B:



Similarly 6-Me favors structure A and 7-Me structure B. Thus those compounds which exerted the greatest inhibitory effect have a preponderance of A in their hybrid, in which form it was deduced that enzyme-substrate combination was most favored. Developing Paul-

ing's concept of the hydrogen bond in biology it was considered that only the $=\text{NH}$ group of the indole nucleus is likely to enter into hydrogen bonding. A can form two such bonds, B can form only one:



They conclude that the combination of indole with the enzyme involves attachment by two hydrogen bonds to two side chains of the enzyme molecule.

The inhibitory action of the methyltryptophans in the further utilization of tryptophan for protein synthesis follows a different order: 4-Me > 5-Me > 6-Me > 7-Me and from this they consider that attachment is not by double bonding on the $=\text{NH}$ group, but presumably concerns the $-\text{CHNH}_2\text{COOH}$ group of the side chain. Since this is remote from the benzene ring and unconnected by a conjugated system, the effect of polar substituents in the benzene ring would fall off simply with the distance of the substituent from the CHNH_2COOH group. They claim that this is consistent with the experimental results. This explanation has been criticized by Dawes (10) since they do not take into consideration the tautomeric effect within the indole nucleus which would operate in exactly similar manner to the methylindoles resulting in increased electron density on carbon atom 3(B) or on carbon atom 9(A), so that the inductomeric effect on the side chain influenced by the position of the substituent would then follow 4-Me > 6-Me > 7-Me > 5-Me and not 4-Me > 5-Me > 6-Me > 7-Me as they report. It is difficult to appreciate what effect on the substrate-enzyme combination this inductomeric effect would have.

We have $-\overset{\ominus}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}$ $\begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$ and electron repulsion along this saturated side chain would soon be damped out. The only possibility

appears to be facilitation of $-\overset{\ominus}{\text{C}}=\overset{\text{O}}{\text{O}}$ which with a negative charge on

the oxygen atom might help substrate-enzyme combination by virtue of increased van der Waals' forces. Moreover, 3-methylindole is without inhibitory effect though a methyl group in position 3 would by its electron repulsion favor structure A in the resonance hybrid and hence by their reasoning exert an inhibitory effect.

They also quote results by Herbert (31) on the efficiency of these methyltryptophans as substrates for tryptophanase and suggest double bonding on the $=\text{NH}$ of the indole nucleus. This receives support in part from Baker, Happold, and Walker (4) who showed that substitution of the $=\text{NH}$ group renders the compound inert to tryptophanase but it does not account for the other facts established by Baker and Happold, *i.e.*, that substrate enzyme attachment cannot occur unless the α -amino and carboxyl groups are intact and unsubstituted.

VII. Inhibition of Indole Production in Culture by Fermentable Carbohydrate

The failure by indole-forming strains to produce indole when glucose was added to an indole-forming medium has long been noted (Fischer, 25).

Neisser (46) and Frieber (26) confirmed these findings with *E. coli communis* and the latter studied the effect with sucrose, lactose, fructose, maltose, and mannitol. Maltose, mannitol, and fructose only delayed indole production and Frieber claimed the production from them of indoleacetic acid in, for example, 24-hour cultures and the formation of indole from this acid after 48 hours.

Evans, Handley, and Happold (20) showed that complete inhibition of indole production and acid formation occurred with arabinose, lactose, and potassium D-gluconate as well as with glucose, fructose, and mannitol, but that acid production without marked inhibition of indole production occurred with D-ribose, rhamnose, glucosamine, hydrochloride, xylose, sorbitol, galactose, and mannose. A common structural clue to this difference in action was not apparent but it confirmed the view of Happold and Hoyle (29) that the failure of indole production could neither be ascribed to acid formation nor to the removal from the medium of a coenzyme factor essential to the tryptophanase complex by the glycolytic system. Polysaccharides and non-fermentable sugars were without influence upon indole formation.

Both Frieber and Neisser suggested that the decomposition of

tryptophan to indoleacetic acid in the presence of glucose was in conformity with their views on indole formation since the glucose provided more readily assimilable carbon than does indoleacetic acid. Thus in the presence of the carbohydrate the reaction was halted at this point and indole was produced only after the utilization of the sugar. The evidence for indoleacetic acid formation depended upon a Salkowski positive and Ehrlich negative reaction, flimsy evidence on which to support any theory. The failure of Woods (65) and of Happold and Hoyle (28) to produce indole from indoleacetic acid in cultures of *Escherichia coli* and the reported failure of the latter workers to discover indoleacetic acid in glucose bouillon cultures of normal strains of *E. coli* refuted this theory.

Happold and Hoyle (29) studied the reasons for the failure of *E. coli* to produce indole in glucose bouillon culture; neither indole formation nor tryptophan loss occurred until all the glucose had been utilized but concurrent with the disappearance of the sugar from the media indole formation and tryptophan utilization commenced; neither indolepropionic nor indoleacetic acids appeared in the culture medium. In the synthetic medium small amounts of indole were produced in the presence of glucose, a contrasting result which will be referred to again. Attempts to obtain a "tryptophanase" preparation from the cells grown on glucose bouillon agar or glucose casein digest agar were entirely unsuccessful. Tryptophanase activity was neither inhibited nor depressed when the enzyme acted upon its substrate in the presence of filtrates from glucose bouillon cultures obtained at different stages in the fermentation process. The authors concluded that the failure of the organism to produce indole under such cultural conditions was due to its inability to produce the enzyme complex. Happold and Hoyle also found small amounts of tryptophanase when the organism was grown in the synthetic medium free from all traces of indole, a finding which Evans, Handley, and Happold (19) were unable to repeat with the "Jebbs" strain which later became their test organism.

In their early studies, Happold and Hoyle had suggested that tryptophanase was "an adaptive enzyme." Fildes (21) suggested that it occurred in the cells both as an "adaptive" and "constitutive" part and that it was the adaptive part of the enzyme complex which was not produced in the presence of glucose. He stated that suspensions of *Escherichia coli* were always capable of catalyzing the oxida-

tion of tryptophan to indole even when grown in the absence of tryptophan or in the presence of glucose. Evans, Handley, and Happold (19) in their re-examination of the position confirmed Fildes' results but showed that they were caused by the adaptation of the viable cells to tryptophan and the consequent production of the tryptophanase complex. Thus suspensions of viable cells grown on glucose bouillon agar, when washed free from all traces of media and subsequently incubated with tryptophan in phosphate buffer pH 7.5 at 37°C. never produced a trace of indole during periods varying between 45 minutes to 2 hours after the addition of the tryptophan, whereas, suspensions of viable cells grown in the presence of tryptophan and absence of glucose and tested in equal cell concentrations had reached their optimum of indole production (87-97% theoretical) in the same period of time. Moreover, the indole production from the glucose-grown cells was autocatalytic in form—a lag phase, a phase of positive acceleration, and a logarithmic phase of production—whereas the normal cells showed activity curves similar in every respect to an enzyme activity curve. This autocatalytic production of indole in the presence of tryptophan by the glucose-grown cells could be explained if the lag period corresponded with a phase of carbohydrate metabolism by the viable cells during which period stored polysaccharide was reduced to a lower level. This explanation was strengthened by the observation that when toluene was added to glucose-grown suspensions (in concentrations which caused little inhibition of tryptophanase activity but which completely inhibited glycolysis), such addition caused complete inhibition of indole production for periods of up to 18 hours. Moreover, the nondisappearance of tryptophan from a culture medium when *Escherichia coli* was grown at 37°C. for 23 hours in the presence of glucose, tryptophan, and seven other amino acids, *i.e.*, when tryptophanase was not formed, was most clearly demonstrated. An improved method for the analysis of tryptophan (41) was used. If the tryptophan was being oxidized even partially by a constitutive tryptophanase some diminution of tryptophan content should occur.

These authors withdrew the earlier suggestion of Happold and Hoyle that tryptophanase could be produced in media which was free from tryptophan but it has to be observed that they were using a different strain of *E. coli*.

There remained the fact, however, that both Fildes and the Leeds

workers had found some slight indole formation in certain synthetic media which contained glucose and tryptophan and clearly this could only mean that some tryptophanase was being formed whereas with glucose bouillon and glucose casein digest and a glucose amino acid medium, neither indole nor tryptophanase was produced. These differences could only be due to the peculiarities of the constitution of the medium and appeared to be related to the amino acids present.

SPECIFIC INHIBITION OF INDOLE PRODUCTION BY *ESCHERICHIA COLI* IN PRESENCE OF PHENYLALANINE OR TYROSINE AND GLUCOSE IN SIMPLE MEDIA

It was observed that complete inhibition of indole formation in Fildes' medium plus glucose and tryptophan could be effected by the addition of a gelatin solution to 3%, that a mixture of amino acids representing those obtained from a hydrolysis of the gelatin caused the same effect, and that, if each of the amino acids were now tested separately in concentrations of 0.01%, phenylalanine (and later tyrosine) completely inhibited indole production. Increased additions of the remaining ineffective amino acids up to 0.2% were incapable of causing complete inhibition of indole production by *Escherichia coli* from tryptophan in the presence of glucose. This apparent protection of tryptophan by phenylalanine or tyrosine in the presence of glucose, this sparing of tryptophan metabolism by these two amino acids alone and glucose (serine and threonine were among those not tested) was the more interesting since they are both cyclic amino acids containing an alanine side chain and since Baker and Happold had shown that the integrity of the alanine group attached to the heterocyclic indole ring was essential to indole formation by suspensions of *E. coli*.

Numerous experiments were next carried out to determine the concentrations of phenylalanine and tyrosine necessary to complete the inhibition of indole production by glucose in Fildes' medium. The following relationships hold:

0.001% L-tryptophan	= 0.001-0.002% L-tyrosine
	= 0.003-0.004% DL-phenylalanine
0.002% L-tryptophan	= 0.003-0.004% L-tyrosine
	= 0.005-0.006% DL-phenylalanine
0.003% L-tryptophan	= 0.004-0.005% L-tyrosine
	= 0.007% DL-phenylalanine

There was evidence here of a stoichiometric relationship with a suggestion that the *D* isomer was probably ineffective. It need only be added that preformed tryptophanase produced almost theoretical yields of indole from tryptophan in the presence of both phenylalanine and tyrosine; as far as could be ascertained the phenylalanine-tyrosine effect was restricted to the growing cell.

The problem seemed to resolve itself into two interrelated questions: (a) the actual mechanism of the glucose inhibition, and (b) the part played by the specific amino acids.

The claims of Willstätter (64) that glucose added to a suspension of yeast cells disappeared from solution concurrent with the synthesis of polysaccharide in the cell, followed by a lag of about 10 minutes before actual fermentation began, and by Pulver and Verzár (49) that the first phase was associated with an absorption of K^+ from the medium while during active fermentation K^+ was released from the cells into the surrounding medium, suggested to the Leeds workers (19) that the lag in tryptophanase production was dependent upon the depression of glycogenolysis (using this term to denote enzymic degradation of polysaccharide) to a low level, *i.e.*, above a certain threshold of intracellular activity, tryptophanase production would not occur.

It was shown that when cells were grown in glucose bouillon agar for 18 hours, washed off with sterile water, and then suspended in phosphate buffer containing tryptophan with varying concentrations of K^+ and Na^+ , in the absence of added K^+ ions, an increased lag in indole production occurred. When K^+ was increased, the lag decreased. These results were taken to indicate that breakdown of reserve carbohydrate preceded the reactivation of the tryptophanase system. Moreover, results with known inhibitors of glycolysis strengthened this view. The secondary stages of oxidation in the glycolytic system were apparently without effect on tryptophanase formation within the cell but a block in the primary oxidation process, the reaction $1,3\text{-glyceraldehyde diphosphate (triose phosphate)} \rightleftharpoons 1,3\text{-diphosphoglycerate}$, delayed or prevented recovery of tryptophanase activity by cells grown in glucose casein digest medium. This was the more striking since *M/33* sodium iodoacetate, which inhibits the triphosphate \rightleftharpoons phosphoglycerate reaction, was without effect upon preformed tryptophanase.

Since glycolysis of glycogen in muscle extracts is inhibited by glucose and freshly prepared glyceraldehyde (45), the action of the

latter on this phenomenon of tryptophanase regeneration was also tested. Glyceraldehyde extended the lag in tryptophanase regeneration; moreover, concentrations of glyceraldehyde which were without effect upon the growth rate of *Escherichia coli* in bouillon culture inhibited indole formation in such cultures.

Glyceraldehyde also exerted a direct inhibitory action upon preformed tryptophanase. Presuming that the added glyceraldehyde after phosphorylation was also oxidized by the phosphoglyceraldehyde oxidase to the phosphoglycerate, these results suggested an interrelationship between the tryptophanase formation and the completion of this primary oxidation process. Thus it is clear that the formation of tryptophanase is linked with the glycolytic system of the cells. Because of this relationship attention was now directed toward the polysaccharide content of the cells. Dawson and Happold (17) investigated the carbohydrate amino acid relations concerned in the inhibition of indole production by glucose in cultures of *E. coli*. The polysaccharide content of the cells was determined by the method of Sahyun (51). The DL amino acids increased the polysaccharide content of the cells when the Jebbs strain of *E. coli* was grown for 18 hours on a medium containing cystine, glycine, valine, glutamic acid, glucose, and tryptophan both with and without the addition of 0.01% L- or DL-phenylalanine or of L- or DL-tyrosine to saturation. The L(-) form was without effect. The polysaccharide content per milligram of dry bacterial weight dropped progressively with the commencement and intensification of indole formation when the tryptophan content of the medium was increased beyond the point when indole formation occurred. Moreover, when mannose replaced glucose in cultures, indole was consistently produced and the polysaccharide content of the cells remained as low or lower than with glucose in the absence of the phenylalanine and similar to values obtained from cells grown in casein digest media in the absence of carbohydrate. These and other results led the authors to assume the proof of the hypothesis that tryptophanase occurred in the cell when the rate of metabolism of previously stored polysaccharide fell below a certain threshold.

The interpretation of these results was fallacious in its simplicity since it was the D form which effected the increase in Sahyun estimated polysaccharide but the L form which completed the glucose inhibition of indole as shown by Ellison (18) (working under the

direction of the author). Moreover, Ellison and Happold showed that in a glucose amino acid medium which contained L-tryptophan 0.003% and L-phenylalanine 0.001%, the latter began to disappear in from 10–12 hours. The concentration of the latter had dropped to 0.0052 and 0.0057 milligram per cent in two experiments after 30 hours' culture and at a point in time just prior to the onset of indole production. If we turn to the relationship previously reported, the inhibition of indole production at 24 hours from 0.003% tryptophan in the presence of glucose was completed by 0.004–0.005% L-tyrosine and 0.007% DL-phenylalanine. The agreement is satisfactory. It is known that for this inhibition to occur the L-phenylalanine must be present over the period of cell division and growth, and that the dialyzable coenzyme system of the tryptophanase complex is present in the cells and in the surrounding medium; thus the inhibition is most likely due to the nonformation of the apoenzyme under these conditions of growth. The technique previously used for the isolation of the free enzyme was applied to the glucose-phenylalanine inhibited cells and the resulting protein fractions examined and contrasted with the tryptophanase-containing fractions from casein digest media by the two-dimensional paper chromatographic method of Consden, Gordon, and Martin (8). The protein fractions were hydrolyzed and phenol and collidine used in turn as solvents. Cystine, serine, and tyrosine appeared as amino acids in both hydrolyzates but glycine, tryptophan, and perhaps histidine occurred also in the tryptophanase-containing fractions. In other words, the phenylalanine-glucose inhibition of tryptophan uptake and tryptophanase formation prevented the occurrence of glycine and tryptophan in these protein fractions. It looks as though—no tryptophan in the complex, no indole in the culture—a reasonable assumption, but why glucose, L-phenylalanine, or L-tyrosine are associated in this inhibition remains a fascinating mystery.

In the same studies there was evidence of slight metabolism of D-phenylalanine by the cells when this isomer was used, but as previously stated, its effect on the glucose inhibition of indole formation is very slight or negligible.

Holdsworth (35) examined the polysaccharide storage of *Corynebacterium diphtheriae* and, on the suggestion of Dr. H. J. Rogers, compared the Sahyun method with a method depending on the acid hydrolysis of washed cell suspensions followed by the determination

of the reducing sugars by the method of Somogyi. The Sahyun method gave relatively low figures. When Dagley and Dawes (9) re-examined the effect of the D-phenylalanine on the polysaccharide storage of *Escherichia coli* and made similar comparisons, they found: (a) a wide variation in the stored polysaccharide content for different strains grown under identical conditions, though each strain gave results which were individually reproducible; and (b) the increased storage of polysaccharide observed when the cells were grown in the presence of D-phenylalanine and the polysaccharide estimated by the Sahyun method was not confirmed by the modified Somogyi method. It seems essential that further attention should be given to the nature of the reducing substance responsible for these differences in value.

References

1. Agner, K., in *Advances in Enzymology*, Vol III, Interscience, New York, 1943, p. 137.
2. Baker, J. W., Dawes, E. A., and Happold, F. C., *Biochem. J.*, **44**, xxxii (1949).
3. Baker, J. W., and Happold, F. C., *Biochem. J.*, **34**, 657 (1940).
4. Baker, J. W., Happold, F. C., and Walker, N., *Biochem. J.*, **40**, 420 (1946).
5. Bellamy, W. D., Umbreit, W. W., and Gunsalus, I. C., *J. Biol. Chem.*, **160**, 461 (1945).
6. Bennett, G. M., and Hafez, M. M., *J. Chem. Soc.*, **287**, 652 (1941).
7. Bergeim, O., *J. Biol. Chem.*, **85**, 219 (1929).
8. Consden, R., Gordon, A. H., and Martin, A. J. P., *Biochem. J.*, **38**, 224 (1944).
9. Dagley, S., and Dawes, E. A., *Biochem. J.*, **45**, 331 (1949).
10. Dawes, E. A., Ph.D. Thesis, University of Leeds (1948).
11. Dawes, E. A., Dawson, J., and Happold, F. C., *Biochem. J.*, **41**, 426 (1947).
12. Dawes, E. A., Dawson, J., and Happold, F. C., *Nature*, **159**, 99 (1947).
13. Dawes, E. A., and Happold, F. C. See Dawes, E. A., *Nature*, **162**, 229 (1948).
14. Dawes, E. A., and Happold, F. C., *Biochem. J.*, **44**, 349 (1949).
15. Dawes, E. A., and Happold, F. C., *Nature*, **164**, 705 (1949).
16. Dawson, J., *Biochem. J.*, **40**, xli (1946).
17. Dawson, J., and Happold, F. C., *Biochem. J.*, **37**, 389 (1943).
18. Ellison, J., Ph.D. Thesis, University of Leeds (1948).
19. Evans, W. C., Handley, W. R. C., and Happold, F. C., *Biochem. J.*, **35**, 207 (1941).
20. Evans, W. C., Handley, W. R. C., and Happold, F. C., *Biochem. J.*, **36**, 311 (1942).
21. Fildes, P., *Biochem. J.*, **32**, 1600 (1938).
22. Fildes, P., *Brit. J. Exptl. Path.*, **22**, 293 (1941).
23. Fildes, P., *Brit. J. Exptl. Path.*, **26**, 418 (1945).
24. Fildes, P., and Rydon, H. N., *Brit. J. Exptl. Path.*, **28**, 211 (1947).
25. Fischer, A., *Biochem. Z.*, **70**, 105 (1915).
26. Friber, W., *Zentr. Bakt. Parasitenk. Abt. I Orig.*, **87**, 254 (1922).
27. Happold, F. C., and Hoyle, L., *Biochem. J.*, **28**, 1171 (1934).
28. Happold, F. C., and Hoyle, L., *Biochem. J.*, **29**, 1918 (1935).
29. Happold, F. C., and Hoyle, L., *Brit. J. Exptl. Path.*, **17**, 136 (1936).

30. Happold, F. C., and Morrison, G. A., *unpublished work*.
31. Herbert, D., cited by Fildes and Rydon, reference 24.
32. Herter, C. A., and Foster, M. L., *J. Biol. Chem.*, **1**, 257 (1905-6)
33. Herzfeld, E., *Biochem. Z.*, **56**, 89 (1913).
34. Herzfeld, E., and Klinger, R., *Zentr. Bakt. Parasitenk. Abt. I Orig.*, **76**, 1 (1915).
35. Holdsworth, F. S., *unpublished work*.
36. Hopkins, F. G., and Cole, S. W., *J. Physiol.*, **29**, 451 (1903).
37. Keilin, D., and Harpley, C. H., *Biochem. J.*, **35**, 688 (1941).
38. Krebs, H. A., Hafez, M. M., and Eggleston, L. V., *Biochem. J.*, **36**, 306 (1942).
39. Kühne, W., *Ber.*, **8**, 206 (1875).
40. Lichstein, H. C., Gunsalus, I. C., and Umbreit, W. W., *J. Biol. Chem.*, **161**, 311 (1945).
41. Lugg, J. W. H., *Biochem. J.*, **31**, 1422 (1937).
42. Macchia, E., *Diagnostica tec. lab. (Napoli), Riv. mensile*, **6**, 752 (1935).
43. Madinaveitia, J., *Biochem. J.*, **40**, 373 (1946).
44. Mozingo, R., Wolf, D. E., Harris, S. A., and Folkers, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1013 (1943).
45. Needham, J., and Lehmann, H., *Biochem. J.*, **31**, 1210 (1937).
46. Neisser, M., *Münch. med. Wochschr.*, **68**, 1384 (1921).
47. Nencki, M., *Ber.*, **8**, 336 (1875).
48. O'Kane, D. O'E. See reference 67.
49. Pulver, R., and Verzář, F., *Nature*, **145**, 823 (1940).
50. Raistrick, H., *Biochem. J.*, **11**, 71 (1917).
51. Sahyun, M., *J. Biol. Chem.*, **93**, 227 (1931).
52. Saito, J., *Z. physiol. Chem.*, **214**, 28 (1933).
53. Salkowski, F., and Salkowski, H., *Z. physiol. Chem.*, **9**, 491 (1885).
54. Silverman, M., and Evans, E. A., *J. Biol. Chem.*, **154**, 521 (1944).
55. Snell, E. E., *Arch. Biochem.*, **2**, 389 (1943).
56. Snell, E. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 194 (1945).
57. Snell, F. D., and Snell, C. T., *Colorimetric Methods of Analysis (Organic and Biological)*. Chapman & Hall, London, 1937.
58. Stephens, H., *J. Chem. Soc.*, **127**, 1874 (1925).
59. Stephenson, M., *Bacterial Metabolism*. 2nd ed., Longmans, Green, London, 1939.
60. Tatum, E. L., Bonner, D., and Beadle, G. W., *Arch. Biochem.*, **3**, 71 (1943).
61. Tatum, E. L., and Bonner, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **30**, 30 (1944).
62. Umbreit, W. W., O'Kane, D. O'E., and Gunsalus, I. C., *J. Biol. Chem.*, **176**, 629 (1948).
63. Umbreit, W. W., Wood, W. A., and Gunsalus, I. C., *J. Biol. Chem.*, **165**, 731 (1946).
64. Willstätter, R., *Enzymologia*, **8**, 1 (1940).
65. Woods, D. D., *Biochem. J.*, **29**, 640 (1935).
66. Woods, D. D., *Biochem. J.*, **29**, 649 (1935).
67. Wood, W. A., Gunsalus, I. C., and Umbreit, W. W., *J. Biol. Chem.*, **170**, 313 (1947).

PHOSPHATASE ALCALINE

Par JEAN ROCHE et NGUYEN-VAN THOAI, *Collège de France, Paris*

TABLE DES MATIÈRES

I. Introduction Générale.....	84
A. Existence de <i>pH</i> optima multiples des actions phosphatasiques. Signification.....	84
B. Phosphatases acides et phosphatases alcalines.....	85
C. Spécificité de la phosphatase alcaline.....	86
II. Identification, préparation, et purification de la phosphatase alcaline....	89
III. Effecteurs de la phosphatase alcaline.....	94
A. Inhibition et inactivation.....	94
B. Activation.....	98
C. Spécificité d'organe et effecteurs.....	104
D. Effecteurs et activité synthétisante.....	105
IV. Sur la constitution de la phosphatase alcaline.....	107
A. Dissociation et reconstitution de la phosphatase alcaline.....	108
B. Réactivation de la phosphatase alcaline au moyen d'effecteurs....	110
C. Hypothèses sur la constitution de la phosphatase alcaline.....	112
V. Conclusions générales.....	117
Bibliographie.....	118

La biochimie des phosphatases est l'un des chapitres de l'enzymologie dont le développement au cours des dernières années a été le plus important. Elle est, par ailleurs, encore en pleine évolution. Aussi n'est-il pas possible de présenter ici sur le mieux étudié de ces enzymes, la phosphatase alcaline, un exposé complet de nos connaissances. Pareil exposé trouverait mieux sa place dans un *Traité* et il a paru plus conforme à l'esprit des *Advances* de donner à notre revue un caractère critique. Nous l'avons limitée à certains aspects de la biochimie de la phosphatase alcaline, sans chercher à exposer la totalité des résultats obtenus sur ceux-ci, ni même à citer l'ensemble des travaux publiés, car leur nombre est considérable.

Le but de cet article est de présenter une étude de la biochimie de la phosphatase alcaline, non sur le plan didactique, mais en accordant une place plus grande aux problèmes en cours d'évolution et en laissant délibérément de côté certains autres. Les techniques d'étude de l'enzyme ont, à l'exception des plus récentes, été décrites dans un ouvrage dont l'intérêt ne s'est pas démenti (20); il n'y avait donc pas lieu d'en reprendre la description. Quant à la chimie physiologique et pathologique de la phosphatase alcaline, à laquelle d'autres revues (47,65,80, 102c,131) ont été consacrées, il n'y avait pas intérêt à la résumer sous un trop faible volume; aussi n'a-t-elle pas été comprise dans le cadre de cet article.

I. Introduction Générale

A. EXISTENCE DE pH OPTIMA MULTIPLES DES ACTIONS PHOSPHATASIQUES. SIGNIFICATION

Tous les enzymes sont caractérisés par un pH optimum d'action dont la valeur peut présenter des différences sensibles d'une préparation à l'autre. Celles-ci sont liées à l'existence d'effecteurs naturels, souvent de cations ou de produits de protéolyse, et la purification de l'enzyme les fait disparaître, parfois en modifiant le pH optimum d'action des produits bruts. Tel est, en particulier, le cas de la lipase pancréatique (147,149), d'estérases végétales (148), de la glucosulfatase (48). On n'a pas décrit jusqu'ici d'enzyme présentant plusieurs pH optima; or il est depuis longtemps établi que les extraits de nombreux organes animaux ou végétaux sont susceptibles de libérer de l'acide orthophosphorique à deux ou trois pH optima à partir de substrats divers (22,28a,82).

Ce caractère particulier des phosphatases n'est pas propre aux phosphomono-estérases; elles le partagent avec les enzymes hydrolysant les acides polyphosphoriques, pyrophosphorique, et adénylpyrophosphorique.* Il a tout d'abord paru lié à la nature des substrats et l'on a pensé que la multiplicité des degrés d'ionisation de ceux-ci expliquait celle des pH optima d'un même enzyme. On peut en effet envisager que l'affinité de celui-ci pour le substrat, affinité dont les variations en fonction du pH sont bien connues, passe par plusieurs maxima correspondant chacun à une combinaison particulière, dont la formation exigerait un degré d'ionisation différent de l'un et de l'autre de ses constituants. Le fait que les dérivés phosphoriques ne renfermant qu'une seule fonction acide sont en général décomposés à un pH optimum unique dans un extrait d'organe défini a été tout d'abord considéré comme favorable à cette hypothèse. Tel est en effet le cas de la métaphosphatase, de pH optimum voisin de 8.0 dans diverses cellules; tel est celui des phosphodiéstérases, dont on a longtemps admis que le pH optimum est voisin de 9.0 ou de 5.0 selon leur origine. Toutefois le défaut de correspondance entre le nombre des fonctions acides des divers substrats et celui des pH optima simultanés de leur dégradation enzymatique s'est rapidement manifesté, en sorte que la théorie est apparue comme artificielle. L'étude de la purification des phosphatases n'a plus laissé subsister de doute sur l'origine de la multiplicité des pH optima de ces enzymes, car elle a conduit à la séparation de plusieurs de ceux-ci, caractérisés chacun par un pH optimum d'action unique.

La notion de l'*isodynamie* des phosphatases (22), admettant l'existence d'enzymes de même spécificité de substrat, mais différant par

* On trouvera un exposé d'ensemble sur la biochimie des phosphatases dans les articles généraux de Folley et Kay (47), de Bamann et Meisenheimer (20), de Schäffner (122), d'Albers (7b), de Roche et Courtois (106), de Moog (80), et de Sols (131).

leur pH optimum unique et leurs effecteurs, n'est aujourd'hui plus discutée. Elle a dominé le développement de la biochimie des enzymes de ce type en même temps que l'étude de la spécificité de leurs substrats.

B. PHOSPHATASES ACIDES ET PHOSPHATASES ALCALINES

Le nom de phosphatase couvre un très grand nombre d'enzymes, dont le caractère commun est de donner naissance à l'acide ortho-phosphorique à partir de substrats divers d'où elles tirent leur nom. Celle à laquelle est consacrée cette revue appartient au groupe des phosphomonoestérases actives sur les monoesters de l'acide phosphorique. Folley et Kay (47), réunissant de multiples observations, ont distingué quatre enzymes dans le cadre de ce groupe et la classification qu'ils ont proposée a été conservée par la suite (7b,106). Il convient seulement de remarquer que l'usage s'est établi d'appeler phosphatases les phosphomonoestérases et nous nous y conformerons.

La phosphomonoestérase la plus communément répandue dans les tissus animaux présente un pH optimum voisin de 9.0; elle est en général désignée sous le nom de "phosphatase alcaline" et répond au type A_1 de Folley et Kay (47). Les autres enzymes isodynames sont actifs à un pH optimum compris entre 3.8 et 6.0 et l'expression "phosphatase acide" est le plus souvent réservée à celle de pH optimum voisin de 5.0 (type A_2 de Folley et Kay). Leur diversité se manifeste dans un ensemble de faits.

En premier lieu, la répartition des deux enzymes n'est pas identique. La phosphatase alcaline, très abondante dans certains tissus animaux (os en croissance, muqueuse intestinale, cortex rénal entre autres) (53,65,70,72) n'existe pas chez les végétaux verts, riches en phosphatase acide; on la rencontre exceptionnellement dans les moisissures (127), les levures (56,123,125,127), et les bactéries (88,91). La première présente une affinité beaucoup plus élevée que la seconde pour le β -glycérophosphate de sodium au pH optimum (35.62,92). La phosphatase alcaline est activée fortement par l'ion magnésium et divers cations (17,18) alors que tel n'est pas le cas de la phosphatase acide. Celle-ci est, par contre, inhibée par les fluorures et les oxalates alcalins, sans action importante sur la première (28), que les cyanures et divers formateurs de complexes (thiols, diéthylthiocarbamate de sodium, α,α' dipyridyl) inhibent spécifiquement (33a-b,114). L'ion PO_4^{3-} est le seul inhibiteur commun à toutes les phosphatases (41,

62,82). Enfin, la stabilité des deux enzymes à divers pH n'est pas identique; la phosphatase alcaline s'inactive rapidement aux pH inférieurs à 5.0, la phosphatase acide à ceux supérieurs à 8.0. Comme la première a pu, par ailleurs, être séparée de la seconde dans les extraits tissulaires, son individualité ne saurait être mise en doute.

C. SPÉCIFICITÉ DE LA PHOSPHATASE ALCALINE

La spécificité des phosphatases acides et alcaline est identique, puisque tous ces enzymes sont isodynamos. On a toutefois décrit des phosphatases alcalines dont l'activité ne s'exerce que sur un très petit nombre de substrats, en sorte qu'un problème particulier est posé par l'étude de la limite de spécificité de ces derniers enzymes.

La phosphatase alcaline hydrolyse les esters les plus divers, indépendamment de la nature du radical organique lié au reste ortho-phosphorique et du nombre de ces radicaux combinés à un même polyol. Le degré d'estérification de l'acide phosphorique détermine seul la spécificité de l'action enzymatique, car les mono- et les diesters d'un même alcool sont dédoublés par des phosphatases différentes. La nature du radical organique du substrat modifie la dissociation des fonctions acides de ce dernier et régit l'affinité de l'enzyme pour lui; aussi la vitesse d'hydrolyse des divers esters n'est-elle pas identique. Quelle que soit l'origine de la phosphatase alcaline, elle agit sur tous les monoesters des alcools primaires et secondaires aliphatiques (12a,12b,58,83a,83b) et des aminoalcools (73,94,95,104), des polyols et des sucres, des cyclols, des phénols (59,61,84,86), sur les nucléotides (70), et les phosphoprotéides (98,99,100).

Il a été possible de préparer des enzymes dont les propriétés générales (pH optimum, effecteurs) sont à peu près identiques à celles de la phosphatase alcaline, mais dont la spécificité apparaît comme beaucoup plus étroite. Comme, par ailleurs, on ne saurait mettre en doute la diversité des phosphatases spécifiquement actives sur des substrats voisins dans le cadre des acides polyphosphoriques (pyrophosphatases, polyphosphatases, adénylpyrophosphatase) on pouvait envisager celle de phosphomonoestérases alcalines non isodynamos. Les critères d'individualité de celles-ci méritent d'être examinés.

La phosphatase alcaline est toujours plus active sur le β -que sur l' α -glycéro-phosphate de sodium, tandis que la phosphatase acide des hématies et des levures l'est plus sur le premier, les autres phosphatases acides l'étant à peu près égale-

ment sur les deux. Or, ce comportement des diverses phosphomonoestérases a paru assez régulier pour être retenu comme élément de classification (47); aussi l'existence éventuelle d'une α et d'une β -glycérophosphatase envisagée par la suite (123) a-t-elle été très discutée (124,127). Une α -glycérophosphatase aurait été isolée des levures (123). Toutefois, il est certain que l'affinité de la phosphatase alcaline est susceptible de se modifier vis-à-vis de l'un des isomères indépendamment de l'autre et l'on peut, dans de multiples conditions expérimentales, inverser le rapport d'hydrolyse des deux esters (34,85,109,128). Pareille variation de l'affinité ne porte pas spécifiquement sur l'un des glycérophosphates; elle peut, dès lors, être interprétée comme ne relevant pas de l'inactivation ou de l'inhibition d'un enzyme particulier à l'un d'eux. Aussi l'opinion qu'il n'existe pas une α - et une β -glycérophosphatase a-t-elle prévalu, bien que le nom de ces enzymes, théoriquement spécifiques d'un seul isomère, demeure couramment employé. Le fait que la phosphatase alcaline est régulièrement plus active sur le dérivé β et conserve cette propriété au cours de sa purification constitue un caractère permanent de cette phosphomonoestérase.

De nombreuses observations montrent que certaines préparations agissent préférentiellement sur un seul ester, comme le fructose 1,6-diphosphate, ou sur un groupe d'esters, comme les 5-nucléotides, et qu'il est possible de renforcer cette propriété par des inhibitions sélectives, des inactivations partielles et des fractionnements. Un enzyme de pH optimum = 9,7, activable par Mg^{++} , hydrolyserait spécifiquement le fructose 1,6-diphosphate, dont il ne détacherait qu'un des restes phosphorylés (50b, 55, 81). Cette hexosediphosphatase, extraite du rein et du foie des mammifères, n'est pas absolument sans action sur d'autres esters glucidiques et il y a lieu de remarquer, pour une discussion ultérieure, qu'elle est préparée par une technique inhibant d'autres activités phosphatasiques par un séjour à $pH = 3.5$. Une 5-nucléotidase active au pH optimum = 9.0 et en présence de Mg^{++} a été préparée à partir du cerveau et des testicules de mammifères et de venins de serpents (29,97). Elle hydrolyse très rapidement les acides adénylique et inosique du muscle (adénosine-5-phosphorique et dérivé), mais non ceux de la levure (adénosine-3-phosphorique et dérivé). Elle est toutefois faiblement active sur ceux-ci et la dialyse des venins fait disparaître cette spécificité apparente (54), car les deux séries de nucléotides sont alors dédoublées avec une vitesse analogue, comme en présence de phosphatase alcaline. L'hydrolyse des esters phosphoriques compris dans les amidons est opérée sans rupture de liaisons glucosidiques par la phosphatase alcaline (114) et l'existence d'une amylophosphatase spécifique (132,140,141) ne doit probablement plus être admise. Le cas de phytases a été particulièrement étudié. Il n'a pas été possible de séparer un enzyme hydrolysant spécifiquement l'acide phytique (inositohexaphosphorique) et les autres esters phosphoriques de l'inositol en milieu alcalin; mais certaines préparations enzymatiques (intestin) dédoublent faiblement ces substrats et de nombreux esters, alors que d'autres sont sans action sur les premiers (33,89,94). Seule une phytase acide spécifique aurait été isolée. En fait, l'activité phytasique alcaline paraît toujours très faible et la discussion porte plus sur une question de degré d'hydrolyse que sur la présence ou l'absence de processus hydrolytiques dans les essais. La position d'attente adoptée par

Flcury et Courtois (46), à savoir qu'il existe probablement des phosphatases de spécificité plus large encore que celle des tissus animaux, inactives sur l'acide phytique, est en accord avec toutes les observations faites jusqu'ici. Cette conception envisage une extension de la spécificité des phosphomonoestérases à certains substrats et non sa restriction à un seul ou à petit nombre de ceux-ci. Quant au cas de la protéinophosphatase (44), il paraît voisin de celui de l'amylophosphatase.

Il ne sera probablement pas possible de formuler d'opinion définitive au sujet de l'existence de ces phosphatases tant qu'aucune n'aura pas été isolée dans un état de pureté plus grand. Une remarque de caractère général doit néanmoins être faite. D'une part, les rapports

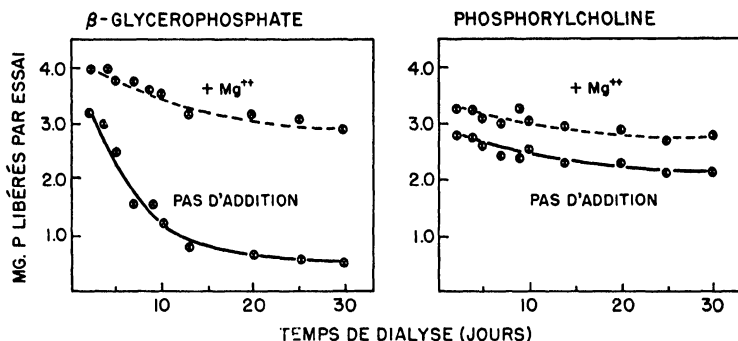


Fig. 1. Inhibition de la phosphatase alcaline purifiée de l'intestin (chien) sur β -glycerophosphate de sodium et sur la phosphorylcholine, à $pH = 9.0$, à divers temps de dialyse contre de l'eau bidistillée à 37° et réactivation par le sulfate de magnésium $1 \times 10^{-2} M$.

d'activité des phosphatases alcalines de diverses origines sur de multiples substrats, assez réguliers dans les extraits bruts de tissu (102b), varient considérablement au cours des opérations les plus diverses et il en est de même de l'action des effecteurs. La perte d'activité par dialyse est plus rapide pour certains substrats et la réactivation n'évolue pas identiquement pour tous ceux-ci. Un exemple de ces faits est reporté sur la figure 1 (104), qui objective la diminution en fonction du temps des activités de la phosphatase sur l'acide glycérophosphorique et sur la phosphorylcholine au cours de la dialyse et la réactivation par l'ion Mg^{++} .

Il est donc possible, non seulement d'observer, mais de provoquer des variations de spécificité. On peut, dès lors, se demander si le dédoublement de l'ensemble des esters n'est pas opéré par un même

groupement actif, mais si chaque type de substrat ne peut pas être accessible à celui-ci uniquement s'il est fixé sur l'enzyme dans une position particulière. Ainsi s'expliquerait que, l'un des groupements de l'apoenzyme susceptible de se combiner à un substrat ou à un type de substrat étant détruit ou bloqué, la spécificité de la phosphatase se trouve alors réduite aux substrats auxquels elle demeure apte à s'unir. Comme on le voit, l'étude des phosphatases alcalines actives sur un petit nombre d'esters mériterait d'être reprise. Quelles que soient les réserves formulées plus haut, il est possible qu'il existe des phosphatases alcalines de spécificité très étroite et de récents travaux sur l'hydrolyse enzymatique du glucose-6-phosphate sont à cet égard prometteurs (37a). Les données exposées dans cette revue portent sur l'enzyme hydrolysant l'ensemble des dérivés énumérés au début de ce paragraphe.

II. Identification, Préparation, et Purification de la Phosphatase Alcaline*

La caractérisation de la phosphatase alcaline dans les milieux où elle existe avec d'autres enzymes isodynames est en général facile à réaliser. On se base pour cela sur le *pH* optimum, voisin de 9,0, et sur l'activation par Mg^{++} . Il a été possible de mettre ainsi en évidence la quasi-ubiquité de la première dans les tissus animaux, que l'histochimie, inaugurée par Gomori (50a), par Takamatsu (132), a par la suite décelée même dans ceux où sa détection chimique avait été négative (cartilages, tuniques vasculaires) (72,101a). De plus, les données obtenues ont indiqué les matières premières les meilleures pour la préparation de l'enzyme, à savoir: la muqueuse intestinale (chien, porc, rat) et les matières fécales (chien), les os en croissance (embryons de mouton, d'homme et de lapin nouveau-né) et le cortex rénal (porc, chien); le foie (porc, chien), notablement moins riche, est parfois un matériel commode. Dans certains extraits, le *pH* optimum est à peine ébauché sur les courbes d'activité en fonction du *pH* déterminées sans effecteurs; il apparaît alors très nettement en présence de sels de magnésium à concentration optima (Cl_2Mg ou SO_4Mg 1.10^{-2} – 5.10^{-3} M) (17) tandis que l'activité

* L'étude technologique de la phosphatase alcaline (mesure de l'activité et applications diverses basées sur celle-ci) n'a pas été entreprise et nous n'indiquerons dans la section II que les principes des méthodes de préparation de cet enzyme.

en milieu acide ne se modifie pas. Ainsi, les extraits aqueux de foie de porc présentent deux courbes d'hydrolyse de l'acide β glycéro-phosphorique très différentes dans la zone alcaline avec et sans addition de Mg^{++} (22). D'autres cas sont moins démonstratifs, en raison de l'existence de facteurs diminuant la sensibilité de la phosphatase alcaline aux effecteurs, sur lesquels nous reviendrons. On s'est également servi dans le même but (28a etc.) d'inhibiteurs spécifiques de phosphatases acides coexistantes. Par exemple, l'enzyme de pH optimum voisin de 5,0 des extraits de foie, de rein (lapin) a été inhibé par les oxalates et les fluorures alcalins, lesquels sont doués d'une action faible ou nulle sur la phosphatase alcaline dans les conditions expérimentales adoptées.

La caractérisation d'un enzyme n'est qu'une étape de son étude préliminaire à sa séparation et à sa purification. Comme, en dehors des os, les tissus riches en phosphatase alcaline renferment en quantité appréciable des enzymes isodynames, l'élimination de ceux-ci est nécessaire. On y parvient par inactivation sélective, par destruction des impuretés (protéolyse) et par des fractionnements opérés au moyen de techniques diverses (adsorption, précipitation par les sels neutres, par les solvants organiques).

Les phosphatases cellulaires ne peuvent pas être extraites quantitativement. Une partie, la plus importante, passe en solution dans l'eau et dans des mélanges hydroalcooliques ou hydroacétoniques (lyoenzymes), l'autre demeurant fixée aux débris protoplasmiques (desmoenzymes) (24), et cela bien qu'il ne semble pas exister de différence de nature entre ces deux fractions (135). Lorsque l'on se borne à préparer des extraits bruts de tissus pour étudier des actions phosphatases, il est indispensable de contrôler soigneusement le temps et le pH d'extraction pour obtenir des résultats comparatifs, car le degré d'autolyse des tissus régit la solubilisation des effecteurs et la stabilité de chaque enzyme varie avec le pH . Une brève extraction (15 minutes à 1 heure) en milieu faiblement alcalin (ammoniacque $M/20$) est particulièrement favorable. Dans le cas du foie (poudre acétonique), la solution obtenue renferme trois phosphatases, de pH optimum respectif 9.2-5.5 et 4.0; sa conservation à 37° et à $pH = 8.3$ inactive la dernière en 30 minutes, la seconde en 24 à 36 heures, avec conservation d'une fraction importante de la première (17). L'adsorption sélective (12a, 109, 126, 139) n'est plus employée que dans des conditions très particulières, en raison de son faible rendement; elle conserve son intérêt pour caractériser une phosphatase présente en petite quantité dans un mélange, car il n'est pas nécessaire pour cela de l'éluer. Les méthodes les plus utiles sont celles mettant en oeuvre les techniques de la chimie des protéines, de préférence sur des autolysats.

L'extraction aqueuse de reins donne une solution renfermant un mélange de phosphatases acide et alcaline, dont le fractionnement au sulfate d'ammonium

entre 2.0 et 2.7 *M* permet de concentrer la seconde dans un produit qui, mis en solution dans l'eau, laisserait spécifiquement précipiter cet enzyme par dialyse (90); mais cette technique est dépourvue d'intérêt pratique (121). Une autolyse préalable est favorable à la préparation de la phosphatase alcaline. Elle conduit à une légère alcalinisation des milieux qui provoque l'inactivation des phosphatases acides. De nombreuses contradictions entre les résultats de divers auteurs en ce qui concerne la présence de celles-ci ne reconnaît sans doute pas d'autre cause. Par ailleurs, elle va de pair avec des processus de dénaturation qui insolubilisent des protéines, enzymatiques ou non, lorsque l'on opère dans des milieux renfermant de l'alcool ou de l'acétone. Ainsi, une brève autolyse des reins ou du cerveau (2 jours à 37°) dans le l'éthanol à 50% libère la phosphatase alcaline de ces organes indépendamment de l'autre enzyme isodynamique présent (32a). La méthode de préparation d'H. et E. Albers (8), qui a permis d'obtenir les premiers produits d'activité assez élevée, comporte une autolyse de 48 heures dans de l'éthanol à 50% additionné de 5% d'un mélange à parties égales de toluène et d'acétate d'éthyle, suivie d'une précipitation de l'extrait par l'éthanol à 60%. Des préparations plus actives encore sont obtenues à partir des produits de fractionnement de cet extrait (rein, intestin) ou de celui recueilli après autolyse de 24 heures en présence d'acétone à 25% (138a).

Ces fractionnements ont été basés soit sur l'un, soit sur plusieurs des principes suivants et parfois associés à la digestion trypsique de protéines accompagnant l'enzyme, lequel n'est pas détruit par l'action de la protéase (26,126). La précipitation par les sels (25,90,125), par l'acétone ou l'éthanol (6c,8,73,101,118b), de solutions aqueuses ou de solutions saturées d'acétate de magnésium (31a) ont été mis en oeuvre. Un essai de repérage des fractions protéiques actives en vue de contrôler leur séparation et d'en augmenter le rendement a récemment été basé sur l'étude des courbes de solubilité des protéines constituant les préparations (30). De toute manière, la préparation de la phosphatase alcaline pure ne doit pas être considérée comme ayant été réalisée, les produits cristallisés doués d'une activité enzymatique élevée et spécifique obtenus à partir du rein (138a) étant probablement constituées par un adsorbat de la phosphomonoestérase à un support cristallisé (3).

L'une des difficultés des recherches auxquelles on se heurte dans ce domaine est l'imprécision relative de la définition de l'activité des préparations. Il convient en effet, pour suivre le fractionnement d'un produit au cours de sa purification de préciser l'activité (Q_P) de chacune des fractions séparées. Or, ceci n'a de sens que si la détermination de Q_P est toujours opérée dans des conditions où l'activité est maxima; tel n'a pas été le cas dans la plupart des travaux et il est, de ce fait, difficile de comparer objectivement les résultats de plus d'un très petit nombre d'entre eux. La méthode de préparation qui a permis d'obtenir

les préparations les plus actives est la suivante (118b). De la muqueuse intestinale de chien (ou, à défaut, de porc) recueillie par raclage au scalpel de l'intestin grêle, est mise à macérer avec son volume d'acétone à 25% et 1/10ème de son volume d'un mélange à parties égales de toluène et d'éther acétique. On maintient l'autolyse 3 jours à la température du laboratoire en agitant de temps en temps. On filtre. Le liquide recueilli est refroidi à -2° et additionné goutte à goutte d'acétone refroidie à -5° jusqu'à ce que la concentration finale de 55% en celle-ci soit atteinte. Cette opération est conduite dans un récipient immergé dans un bain de glace, au sein duquel on laisse déposer le précipité riche en enzyme qui se forme. On centrifuge, on lave le culot protéique à l'acétone anhydre glacée et on conserve le produit sous vide après dessiccation sur acide sulfurique et pulvérisation au mortier. La technique peut également être appliquée à d'autres organes (rein, foie, os). Le produit brut auquel elle donne naissance, mis en solution à 2% dans l'eau, est soumis à 0° à des précipitations fractionnées successives par l'acétone à -5° , au bain de glace. Les précipités que l'on recueille entre 35 et 50% en acétone renferment la plus grande partie de l'enzyme et sont relativement pauvres en impuretés protéiques. Il y a lieu de signaler que l'acétone inactive progressivement la phosphatase purifiée, beaucoup moins stable que l'enzyme brut, aux températures supérieures à 0° . L'élimination par digestion trypsique de protéines accompagnant l'enzyme peut utilement être ajoutée à ces opérations (2).

On ne peut pas encore caractériser la phosphatase alcaline par sa composition et son activité, mais seulement faire état des caractères

TABLEAU I

ACTIVITÉ EN PRÉSENCE DE Mg^{++} ET COMPOSITION DE QUELQUES PRÉPARATIONS DE PHOSPHATASE ALCAINE PURIFIÉE PAR DIVERSES TECHNIQUES

Origine de la préparation	Réf.	Q_P	N, %	Glucides, %	Mg, %	Zn, %
Intestin.....	126	—	10.1	21.1	—	—
Intestin.....	2b	105,000	14.0	0	—	—
Intestin (réactivé après dialyse)..	105	175,000	12.8-14.0	3.5	0.5-0.3	0.02-0.05
Fèces.....	2a	84,500	10-11	0	—	—
Glande mammaire	31b	28,700	8-10	—	—	—
Rein.....	2c	24,500	14 0	—	—	—
Rein.....	*	24,500	12.8	—	0.3	0.03
Rein.....	16	—	—	—	—	0.05
Rein.....	8	11,500	15.0	—	<0.1	—

* Données non publiées établies par M. Roger.

de ses préparations les plus actives obtenues par divers auteurs. Toutes sont protéiques et renferment des cendres, dont le magnésium

et le zinc sont des constituants réguliers. Certaines (126) sont riches en glucides renfermant de la glucosamine et la question de la présence de ces produits en tant que constituants de l'enzyme a été posée. Elle ne doit pas être retenue, car des préparations d'une très haute activité ne renferment que très peu, ou pas, de glucides (2c,105). Quelques données sur la composition de diverses préparations purifiées ont été rassemblées dans le Tableau I.

La teneur en azote des préparations est en général assez basse, même lorsqu'elles ne renferment pas de glucides (mucoprotéines). Par ailleurs, leur teneur en cendres présente des différences notables (1.5 à 4.0% dans les produits obtenus par précipitation acétonique fractionnée) et une partie des éléments minéraux est certainement étrangère à l'enzyme. Le magnésium est en général présent à un taux relativement élevé (0.5 à 1.0%) et la fraction de cet élément liée à la phosphatase est difficile à préciser, car, si sa perte par dialyse est en partie imputable à l'élimination de phosphate de magnésium, la réactivation de l'enzyme exige par ailleurs l'addition de Mg^{++} ou d'un des cations divalents avec lesquels il est interchangeable (33,112b). Enfin, lorsque l'inactivation totale par dialyse se manifeste, les préparations intestinales renferment encore jusqu'à 0.1% de magnésium, c'est à dire autant que celles d'enzyme rénal obtenues par Albers et Albers (8). Quant au zinc, il n'est présent qu'à l'état de traces (0.03–0.06%) et son taux ne semble pas subir au cours des purifications des variations parallèles à celles de l'activité. Le spectre ultraviolet des préparations les plus actives (6e,31b,51,102c, 129) est analogue à celui de multiples protéines non enzymatiques et l'on n'y décèle la présence d'aucun constituant susceptible de jouer le rôle de coenzyme. Le seul élément de composition particulier est une teneur élevée en magnésium, une partie seulement de ce métal paraissant spécifiquement liée à l'activité enzymatique.

Il est difficile de préciser la signification des données obtenues jusqu'ici sur le poids moléculaire (P.M. = 6,000–10,000) et le point isoélectrique ($pH_i = 9.0$) de la phosphatase alcaline (8,32a); leur établissement sur des produits d'un degré de pureté élevé est nécessaire pour en contrôler la validité. Néanmoins, l'ultracentrifugation des milieux renfermant cet enzyme montre qu'il se sédimente avec des particules globuliniques (68); il est possible qu'il soit simplement fixé à certaines de celles-ci (64), dont le poids moléculaire est d'un ordre de grandeur élevé.

III. Effecteurs de la Phosphatase Alcaline

Les propriétés générales de cet enzyme ont été énumérées à propos de la différenciation des phosphatases acides et alcaline et nous n'étudierons avec quelques détails que certaines d'entre elles. Son pH optimum a fait l'objet de divers travaux. La valeur de 9.25 a été établie pour des préparations d'enzyme rénal à partir de données expérimentales très rigoureuses, relatives à la vitesse initiale de l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium (8). Des valeurs notablement inférieures ont souvent été enregistrées au cours d'expériences de longue durée, l'inactivation de l'enzyme étant d'autant plus importante que le pH est plus alcalin. Enfin, le pH optimum de l'hydrolyse est fonction de la nature des substrats (37,55,66b,102), probablement en raison des différences existant dans le degré de dissociation (pK) des fonctions acides de ceux-ci, et la présence d'effecteurs peut le modifier (4,5). De toute manière, l'étude de l'action de l'enzyme au pH optimum exige des essais à une série de pH compris entre 8.0 et 10.0, afin d'éviter des erreurs tenant à de légers décalages du pH optimum sous l'influence de facteurs multiples. L'activation, l'inhibition, et l'inactivation de la phosphatase alcaline ont en outre servi à préciser ses caractères selon des modalités qui méritent d'être passées en revue.

Nous n'envisagerons ici que les effecteurs spécifiques de la phosphatase alcaline et l'inactivation de celle-ci, dans la mesure où elle permet de la caractériser. L'inactivation par dissociation d'une cophosphatase hypothétique sera traitée dans la section III. De même, l'action d'inhibiteurs n'ayant pas été étudiés en présence d'enzymes purifiés, tels que l'alloxane (77), la phlorhidzine (95a) n'a pas été discutée, car il est possible qu'elle soit en partie indirecte et son mécanisme ne peut pas être interprété.

A. INHIBITION ET INACTIVATION

1. Action des formateurs de complexe

On s'est rapidement rendu compte que les inhibiteurs les plus efficaces de l'enzyme sont constitués par certains formateurs de complexe. Comme avec divers autres enzymes à métal dissociable (cf. 102d), les cyanures alcalins, la cystéine, le glutathion sont inhibiteurs, mais à des concentrations variant d'un extrait de tissu à un autre ($5 \cdot 10^{-4}$ à $10^{-2} M$). Ainsi, les extraits de poudre acé-

tonique de tumeurs sont plus sensibles que ceux de foie. De plus, les mêmes corps sont parfois activateurs à faible concentration. Par ailleurs, les extraits d'organes desséchés sont en général plus fortement inhibés par ces effecteurs et la conservation des préparations à l'air augmente souvent leur activité, en raison de l'oxydation des —SH présents. Le gain apparent en nombre d'unités phosphatasiques total des préparations au cours de leur fractionnement relève également de l'élimination (ou de la modification) d'effecteurs naturels, dont les thiols libérés au cours de la protéolyse (cystéine et peptides de cystéine) paraissent les mieux caractérisés. Les faits observés s'expliquent en admettant que les effets activateurs et inhibiteurs des cyanures et des thiols résident, les premiers dans le blocage de métaux lourds inhibiteurs, les seconds, dans la combinaison de ces corps à un constituant métallique de l'enzyme lorsqu'ils sont présents à concentration plus élevée. Cette interprétation, donnée en 1932 par Edlbacher et Kutscher (38) a été déformée au cours de travaux ultérieurs, orientés vers l'étude de l'influence du potentiel d'oxydoréduction sur les processus enzymatiques de phosphorylation évoluant dans les cellules. Par analogie avec des faits observés dans des réactions de protéolyse, l'action des thiols a été considérée, à tort, comme s'exerçant indirectement, en modifiant le potentiel du milieu (123,142), et cela bien que l'oxydation des préparations enzymatiques par l'acide monoiodacétique, l'eau oxygénée, le ferricyanure de potassium, soit sans action (67,71,108a).

Les travaux les plus récents ont confirmé le point de vue initial d'Edlbacher et Kutscher. Quel que soit le substrat utilisé, l'origine de la phosphatase alcaline (os [146], rein, foie, cerveau [49], intestin [108b], sérum [133,134], levures [56,77]), il est légitime de rattacher l'action des cyanures, de la cystéine, de l'éthylmercaptan, du glutathion, de l'acide thioglycolique à la formation de complexes avec des constituants des préparations enzymatiques: métaux jouant le rôle d'inhibiteurs naturels que de faibles concentrations de l'effecteur suffisent à bloquer, métaux participant à la molécule enzymatique et qui ne réagissent avec l'effecteur qu'à concentration relativement élevée. Du point de vue expérimental, l'étude de ces inhibiteurs ne peut donner de résultats précis que si elle est poursuivie systématiquement à une série de concentrations, puisque leurs effets sont susceptibles d'être inverses selon celles-ci. Pareille remarque s'applique à l'action de l'acide ascorbique (66a,133,134), des acides

aminés (15,29a,b,c), toujours inhibiteurs à forte concentration, mais pouvant d'être activateurs à de faibles taux dans des conditions particulières (60,108a et b).

D'autres formateurs de complexe non susceptibles d'agir en outre à titre de corps réducteurs, comme les thiols, les cyanures, les sulfites, l'acide ascorbique, sont également efficaces: ce sont le diéthylthiocarbamate de sodium, la phénanthroline, *l'*- α,α' -dipyridyl, les tungstates (33c,d,115). Leur mécanisme d'action peut, comme celui des précédents, résider en un blocage de métaux avec formation d'un complexe: enzyme-métal-inhibiteur inactif. Mais il peut aussi consister en l'élimination à l'état de complexe de cations détachés de la protéine enzymatique, la dissociation de la combinaison métallique constituant l'enzyme étant favorisée par un simple déplacement de l'équilibre et le métal bloqué au fur et à mesure de son apparition à l'état ionisé. Il semble bien qu'il en soit ainsi lors de l'inhibition par des produits tels que les formateurs organiques de complexe; car, d'une part la dialyse contre des solutions de ceux-ci favorise beaucoup leur action et, d'autre part, cette dernière persiste après élimination de ces produits (115). Par exemple, des solutions de phosphatase alcaline inactivées par dialyse contre des solutions d' α,α' -dipyridyl ou de diéthylthiocarbamate de sodium, puis contre de l'eau distillée, demeurent inactives après cette dernière opération, et cela bien que ne renfermant plus alors le réactif initialement utilisé et pouvant, par ailleurs être réactivées par des cations en présence d'acides aminés (118). L'action des cyanures est sans doute plus complexe, car CN^- se combine aux enzymes comme aux autres protéines au même titre que divers anions et son élimination exige alors une dialyse prolongée, ou l'addition de cations susceptibles de s'unir à lui. C'est là la raison pour laquelle Cloetens (33c,d,e) a pu observer que l'addition préalable de Zn^{++} était indispensable pour réactiver par Mg^{++} la phosphatase inactivée par KCN et soumise ensuite à 4 jours de dialyse contre une solution diluée de CO_2NaH .

L'inhibition du type étudié est régie en premier lieu par les rapports d'affinité entre la protéine enzymatique, le constituant métallique de la phosphatase et l'effecteur; celui-ci est actif dans la mesure où il réagit avec les deux autres. Comme on le verra plus bas, une série de cations divalents sont susceptibles de réactiver la phosphatase alcaline à un degré voisin (118b). En raison même de cette inter-

changeabilité de son constituant métallique, la phosphatase doit pouvoir réagir avec les divers cations divalents présents dans les cellules qui la renferment et sa composition ne doit pas toujours être la même en ce qui concerne ceux-ci. Il n'est pas impossible qu'elle comprenne un mélange de métaux en concentration variable, avec forte prédominance de magnésium. L'action des thiols, des cyanures, des autres formateurs de complexe, dépendrait de la nature et des taux respectifs des divers constituants métalliques. Aussi ne peut-elle être que variable en intensité; elle ne saurait être constante que si l'enzyme a été inactivé par élimination de son (ou de ses) métal naturel et réactivé avec un seul cation. Par exemple, l'ion F^- est en général dépourvu d'action sur elle, mais est un inhibiteur efficace de cet enzyme dans les extraits de foie de porc, où il est possible que le magnésium soit le seul métal présent (75). Pour la même raison, les oxalates alcalins et les acides biliaires se comportent comme des inhibiteurs occasionnels (28,45,108b), sauf en ce qui concerne l'action des seconds sur les préparations d'origine intestinale (29c). L'étude de ce type d'inhibition a fait faire d'importants progrès à la biochimie de la phosphatase, puisqu'elle a conduit à préciser la caractérisation de celle-ci et a orienté les recherches vers l'existence dans ses préparations de métaux dissociables.

2. Inactivation par destruction ou blocage de groupements aminés ou thiols

L'activité phosphatasique peut être affectée par des réactions portant sur la partie protéique de l'enzyme. Les résultats obtenus sont toutefois d'interprétation délicate, car il n'a pas été possible de réaliser réversiblement des inactivations dues à des processus de cette nature. L'acide nitreux, le cétène, l'isocyanate de phényle, le formol, inhibent la phosphatase alcaline, dont certains groupements aminés primaires sont alors bloqués ou détruits (10,51,103). L'action du formol ne peut pas être réversée par les sels ammoniacaux ou la dialyse, sans doute parce qu'elle comporte une dénaturation de la protéine (103). Certains des réactifs mis en oeuvre dans ces essais ne sont pas spécifiques des groupements $-NH_2$ et leur action porte également sur des groupements $-SH$ ou $-OH$, ces derniers ne jouant à peu près certainement aucun rôle dans la catalyse enzymatique. L'intervention des groupements thiol dans celle-ci est peu probable,

car, comme on l'a vu, l'iode à faible concentration et l'acide monoiodacétique, sont sans action, comme divers oxydants et réducteurs dans une très large marge de rH (107,129). Néanmoins, dans le cas de l'hydrolyse de l'hexosediphosphatase, il a été récemment signalé (143) que l'acide monoiodacétique, l'alloxane, le nitrate phénylmercurique se comportent comme des inhibiteurs et que la cystéine s'oppose à leur action. Des faits analogues, mais de signification peu claire ont été enregistrés avec l'adénylpyrophosphatase, dont l'inhibition partielle (30%) par l'acide monoiodacétique $10^{-2} M$ évolue parallèlement à la disparition de groupements $-SH$, mais est beaucoup moins forte que celle provoquée par le chloromercurobenzoate, réactif plus spécifique de $-SH$ (25,40).

Le rôle des groupements $-NH_2$ dans l'activité enzymatique ne peut pas encore être interprété. On peut penser qu'il consiste à participer à des complexes du métal indispensable à celle-ci, la stabilité de ces combinaisons pouvant être modifiée expérimentalement par la présence de corps susceptibles d'entrer en concurrence avec la protéine pour s'unir au métal. Ainsi se rejoignent les déductions tirées de l'étude des deux modes d'inhibition envisagés: l'élimination d'un constituant métallique naturel par entraînement dans un complexe détruit l'activité phosphatasique et, par ailleurs, elle comporte la décomposition d'un complexe métalloprotéidique apparaissant comme un élément essentiel de la structure de l'enzyme.

B. ACTIVATION

1. Activation par les cations divalents

L'inhibition par des formateurs de complexe constitue une présumption importante en faveur de la présence de métaux dans la molécule enzymatique. En effet, comme l'ont rappelé Warburg et Christian à propos de leurs recherches sur l'énolase: "Lorsque des formateurs de complexe différents inhibent un enzyme, il en résulte que, selon un principe qui n'a pas été mis en défaut depuis 1923 (145), le ferment est une combinaison dissociable de métal lourd (144)." Dans le cas de la phosphatase alcaline, la signification des résultats obtenus n'a été comprise que longtemps après la découverte de l'activation de la phosphatase du rein par Mg^{++} (Erdtmann, 41). Ce dernier n'a tout d'abord été considéré que comme un réactif commode pour différencier la phosphatase alcaline des phosphatases acides des

tissus et sa participation possible à la constitution de la première n'a été comprise qu'avec la mise en évidence de l'action d'autres cations divalents (18,112b,115).

Celle du magnésium elle-même peut ne pas se manifester dans certaines préparations brutes (13,23,136), où celle du manganèse est plus irrégulière encore (6d); celle du zinc est si faible dans les extraits de certains organes qu'elle a pu, à l'origine, être considérée par divers auteurs comme spécifique de l'enzyme de tissus particuliers (75,77). En dehors de Mg^{++} , Mn^{++} , et Zn^{++} , les ions Co^{++} , Ni^{++} , Fe^{++} , et Ca^{++} sont activateurs dans des conditions particulières (18,19, 112b,115) tandis qu' Hg^{++} n'a pu être considéré comme tel que pour des préparations renfermant des cyanures (antiinhibition) (33d,e). L'étude des effecteurs métalliques a été pleine d'enseignements à beaucoup d'égards, mais elle donne encore lieu à de multiples contradictions, tenant à des causes qu'il y a lieu d'examiner.

La sensibilité de l'enzyme aux cations est fonction de variables diverses. Elle est inconstante dans les produits bruts, mais augmente et devient régulière au cours de la purification (23). Par exemple, Mn^{++} n'est pas considéré comme un activateur par certains (6d) en raison de son défaut d'efficacité sur des extraits d'organes; de même Zn^{++} et Fe^{++} . Par contre, Mn^{++} exerce sur la phosphatase du foie de porc dialysée (extrait de poudre de foie traitée par l'acétone dans l'ammoniaque $M/40$, temps de contact 15 minutes, dialyse 2 jours) une activation plus forte que celle de Mg^{++} (24.974% au lieu de 9.807%) (19). Enfin, après une très longue dialyse contre de l'eau bidistillée (2 à 4 semaines), Mg^{++} provoque l'activation la plus forte, celles de Mn^{++} et de Zn^{++} étant néanmoins du même ordre de grandeur. On ne peut, en fait, tirer de conclusion ferme que des données établies sur des enzymes purifiés et il est regrettable que cette notion n'ait pas été retenue, même au cours de récents travaux sur l'action des effecteurs métalliques. L'inégale sensibilité des fractions lyo- et desmoenzymatiques à Mg^{++} n'est que l'un des aspects du problème de la susceptibilité de la phosphatase aux cations, puisqu'une dialyse prolongée de la seconde suffit à la rendre identique à la première à cet égard (136). Par ailleurs, il est certain que le pH du milieu (41) et la nature du substrat (104) sont des facteurs importants de l'activation. Ainsi, la phosphatase intestinale purifiée est beaucoup plus fortement activée par Mg^{++} ou Mn^{++} dans l'hydrolyse des glycérophosphates que dans celle de la phosphoryl-

choline ou de la phosphorylcolamine (104). De plus sa sensibilité à ces cations augmente de façon importante et progressive au cours de la dialyse prolongée (4 semaines) contre de l'eau bidistillée, pour ce qui est de l'hydrolyse des glycérophosphates, mais beaucoup moins pour ce qui est de celle des deux autres esters (104). Par contre l'origine de l'enzyme (bactéries, levures, tissus animaux divers) paraît sans influence bien définie (33,91,93,112b,133), sauf pour ce qui est de certaines réactivations (29f).

Un autre caractère de l'action des cations réside dans l'existence de concentrations optima en effecteurs. Cette notion, due à Jenner et Kay en ce qui concerne Mg^{++} (63), a été par la suite généralisée (112b), puis modifiée pour cet ion. Jusqu'à un degré élevé de pureté, la phosphatase est activée par les sels de magnésium proportionnellement à la concentration du milieu en ceux-ci tant qu'elle ne dépasse pas 1×10^{-2} à $5 \times 10^{-3} M$; au delà de cette concentration optima, l'activation est moindre et l'on peut même enregistrer de légères inhibitions à des taux très élevés en sels. Les préparations hautement purifiées présentent, par contre, une activation maxima à partir d'une certaine concentration en Mg^{++} et au delà de celle-ci; l'effet inhibiteur des fortes teneurs en cet ion ne s'y manifeste plus (2c,118b). Pour tous les autres cations étudiés (118b) il existe un optimum de concentration activatrice et l'on observe une inversion des effets lorsque l'on passe des taux faibles aux taux élevés en sel. La concentration optima est très différente avec les divers cations; elle est très faible pour Zn^{++} (1×10^{-6} à $1 \times 10^{-5} M$), pour Fe^{++} ($1 \times 10^{-4} M$) et sensiblement plus forte pour Mn^{++} ($1 \times 10^{-3} M$). Il est manifeste que certains auteurs n'ont observé que l'action inhibitrice de ces divers cations en raison de l'emploi de concentrations trop élevées en ceux-ci. En l'absence d'informations sur la pureté d'une préparation de phosphatase sa réactivité vis à vis des cations ne peut être définie que par rapport à une série de concentrations en ceux-ci. Le mode d'action des cations sera examiné à propos de la constitution de l'enzyme à laquelle il est lié.

2. Action des acides aminés

L'activation par ces corps de l'uréase (11), de l'amylase de diverses origines (119,128), de la lipase pancréatique (36) a suscité des re-

cherches sur l'influence des acides aminés sur la phosphatase alcaline, laquelle s'est montrée activable par eux à des concentrations parfois très faibles (0.0025 *M* de glycoColle), la créatine et la créatinine étant inefficaces (29a,96). Malgré une première contradiction (6d), les observations initiales de Bodansky ont été confirmées par la suite (60,108b). Les pourcentages d'activation sont augmentés par la dialyse, éliminant les produits d'autolyse des tissus; ils peuvent alors atteindre 500% du pouvoir phosphatasique initial et il existe une concentration optima (5×10^{-3} à 5×10^{-2} *M*) en divers monoacides monoaminés. Une exception est constituée par la cystéine, dont l'effet activateur, très prononcé à de faibles concentrations (5×10^{-5} à 5×10^{-4} *M*), diminue à des taux plus élevés et fait place à partir d'une certaine concentration, à une action inhibitrice; cette dernière est due au groupement —SH. Elle est, à de faibles concentrations en cystéine, masquée par l'action antagoniste du reste de la molécule tandis qu'elle prédomine à des taux élevés en acide aminé. Divers polypeptides (glycylglycine, alarylglycine, leucylglycine) se comportent à cet égard comme les aminoacides qu'ils renferment. La réaction ne semble pas liée au caractère fortement polaire de l'effecteur, car l'anhydride de glycine la présente, bien que dépourvu de groupements aminé et carboxyle libres (118a). Les phosphatases de diverses origines ne paraissent pas se comporter identiquement, car les résultats résumés plus haut, obtenus avec l'enzyme intestinal, ne peuvent être retrouvés régulièrement avec celui d'autres organes qu'en ce qui concerne l'inhibition par des taux relativement élevés d'acides aminés (29c). La L-histidine active fortement les préparations de phosphatase fécale hautement purifiées et dialysées (2×10^{-3} *M*) (2a) alors qu'elle inhibe celles d'enzyme intestinal, osseux, rénal (4.6×10^{-3} *M*) (29). La cystéine serait sans effet sur les préparations d'origine fécale ou rénale, ces dernières étant insensibles au glycoColle (2a). Il est possible que les différences signalées entre les phosphatases des divers tissus tiennent en partie à des impuretés les accompagnant dans les préparations étudiées et ne soient pas caractéristiques. Il est toutefois certain que les acides aminés et les peptides sont activateurs des phosphatases intestinale et fécale (de même origine) à faible concentration et inhibiteurs de toutes les phosphatases alcalines à un taux élevé.

3. *Synergie ou antagonisme entre effecteurs. Coactivation, concurrence et antiinhibition*

A plusieurs reprises il a été mentionné que l'action d'un effecteur varie selon les conditions dans lesquelles on l'étudie et ne devient régulière que sur l'enzyme purifié. Il en est ainsi pour plusieurs raisons. Les unes qui seront discutées plus bas, tiennent à la nature de la phosphatase les autres au fait que l'enzyme est toujours présent dans les cellules et les humeurs avec un cortège d'effecteurs dont les uns tendent à réduire, les autres à favoriser l'activité enzymatique. Deux principales éventualités se présentent alors: ou bien les effecteurs agissent indépendamment les uns des autres et leur activité globale est la somme de celle de chacun; ou bien l'action de l'un d'eux potentialise celle d'autres. La première est celle de la concurrence des activateurs et de l'antiinhibition; la seconde est celle de la coactivation.

L'étude quantitative de l'activation de la phosphomonoestérase alcaline par Mg^{++} a montré que l'intensité de ce phénomène est très variable et qu'elle est en général d'autant plus grande que l'enzyme est plus pur. L'hypothèse qu'il en est ainsi parce que les préparations brutes renferment d'autres cations activateurs en concurrence avec le magnésium pouvait expliquer ce fait, comme elle explique l'inhibition par les phosphates (62). Après dialyse prolongée contre des formateurs de complexe (diéthylthiocarbamate, α, α' -dipyridyl), puis contre de l'eau bidistillée, les extraits d'organe sont très fortement activables par Mg^{++} , mais perdent cette propriété s'ils ont, avant l'addition de cet ion, été dialysés contre des solutions renfermant un mélange d'autres cations divalents (Ca^{++} , Mn^{++} , Zn^{++}) activateurs. La dialyse prolongée de solutions enzymatiques brutes contre l' α, α' -dipyridyl permet d'obtenir des préparations fortement activables par des mélanges de Ca^{++} , Mg^{++} , et Mn^{++} renfermant chacun de ces ions à concentration inférieure à celle provoquant la même activation par un seul d'entre eux (concentration inférieure à l'optimum); Fe^{++} et Zn^{++} sont alors inhibiteurs même à de très faibles taux. Ces exemples montrent que les effets des divers cations manifestent une additivité certaine, puisque la concentration optima de leur mélange peut être atteinte, puis dépassée, par addition en quantité progressivement croissante de l'un quelconque des constituants de leur mélange. Ces observations permettent de

prévoir l'interchangeabilité du métal participant à la structure de la phosphatase; elles expliquent par ailleurs l'inégale réactivité aux cations des préparations brutes, car celles-ci renferment en proportion variable des métaux, activateurs ou inhibiteurs selon leur concentration au voisinage de la molécule d'enzyme. L'antiinhibition par les formateurs de complexe à faible taux relève de la même cause.

Ainsi, l'explication la plus plausible d'activations par les cyanures, les thiols, l'acide ascorbique à très faible concentration est que ces corps se combinent à des inhibiteurs naturels métalliques. L'exemple le plus typique de faits de cet ordre est la réactivation par l'hydrogène sulfuré de la saccharase inhibée par l'argent (43). Dans le cas des phosphatases, l'élimination de métaux spécifiquement inhibiteurs, tels que le cuivre, ajoutés aux préparations peut être opérée *in vitro* par action de la cystéine, du cyanure de potassium; elle réactive l'enzyme. Dès lors, la formation de complexes métalliques avec des constituants naturels des préparations gênant l'activité enzymatique conduit à une antiinhibition dont la conséquence est une activation apparente. Mais, comme la réaction porte également sur des métaux activateurs, on observe la résultante de deux effets; l'antiinhibition prédomine à faible concentration du formateur de complexe, l'inhibition au dessus d'un certain taux. Il est d'ailleurs possible que les deux manifestations soient dues à une réaction avec un seul métal car, s'il est présent à une concentration dépassant l'optimum au niveau de l'enzyme, on doit réaliser une antiinhibition en éliminant son excès, puis une inhibition en bloquant la fraction sur laquelle repose l'activité phosphatasique. D'autres exemples d'antagonisme sont fournis par la neutralisation de l'action de F^- par Mg^{++} (28c) et par la réactivation au moyen de Co^{++} de l'enzyme des os inhibé par un excès d'acide aminé (29c).

L'action des cations s'exerce en synergie avec celle des acides aminés. Erdtmann (41) a depuis longtemps observé que les produits de dialyse de l'enzyme (rein) renfermant du magnésium sont plus fortement activateurs que leurs cendres. Ce fait, confirmé par la suite (39,42,116), montre que l'activité de l'enzyme est liée à l'association d'un métal et d'un corps organique. Celle de l'ion Zn^{++} sur des préparations intestinales (rat) est fonction de la présence des produits de la protéolyse, lesquels peuvent être remplacés par des acides aminés définis. Sauf à très faible concentration, Zn^{++} est inhibiteur après dialyse des extraits de muqueuse intestinale dans des

conditions où il active les mêmes produits non dialysés (60). C'est surtout au cours des processus de réactivation de la phosphatase inactivée par dialyse prolongée (plusieurs semaines) que la synergie des acides aminés et des cations se manifeste; elle n'est pas alors particulière à Zn^{++} , mais Ca^{++} , Fe^{++} , Mg^{++} , et Mn^{++} y participent (118b). Le rôle coactivateur des acides aminés, négligé à tort par certains auteurs étudiant les effets propres de ces corps, paraît important non seulement dans le cas de la phosphomonoestérase alcaline, mais dans ceux de nombreux enzymes à métal dissociable: zymohexase (144) ~~peptidases~~ (74,113,130), pyrophosphatase alcaline (117), adénylpyrophosphatase (14). Son mécanisme sera discuté plus bas.

Les actions synergiques, les concurrences et les antagonismes entre effecteurs présentent une intensité qui ne peut être définie dans les préparations non purifiées, plus ou moins riches en activateurs et en inhibiteurs naturels; aussi n'est-il pas surprenant que l'étude de la phosphatase alcaline ait conduit dans ce domaine à de multiples contradictions, en apparence inexplicables.

C. SPÉCIFICITÉ D'ORGANE ET EFFECTEURS

L'inégale sensibilité aux effecteurs de la phosphatase alcaline selon son origine a permis de penser que les divers organes renferment chacun un enzyme particulier (29c). Divers arguments, à la vérité assez fragiles, ont tout d'abord étayé cette opinion; ils étaient basés uniquement sur l'inégale sensibilité aux effecteurs de la phosphatase extraite de différents organes, mais celle-ci demeurerait mal définie. Par exemple, l'enzyme osseux était considéré par certains comme insensible à Mg^{++} , par d'autres comme activable par lui (28a,29c,73). Enfin, les faits observés ont été interprétés comme tenant à la présence en proportions diverses de deux phosphatases dans les différents tissus animaux; cette opinion, entièrement hypothétique, est basée sur l'inégalité d'action de KCN sur les extraits des organes (33a,33b).

La phosphatase intestinale s'est révélée nettement moins sensible que celle des autres organes à de multiples effecteurs, entre autres les acides aminés (29b), les acides biliaires (29c), le formol (1,51, 103), les esters méthyliques des deux formes tautomères de l'acide cyanhydrique (79). De même, l'effet antiinhibiteur de Co^{++} vis à vis de la phosphatase inhibée par un excès d'acide aminé se manifeste, en présence de Mg^{++} , vis à vis de l'enzyme osseux, non de

l'enzyme intestinal (29f). Il était dès lors probable que les enzymes des autres organes ne soient pas identiques entre eux. Les essais basés sur l'action des fluorures, des oxalates, de l'acide cholique, des thiols, de Mg^{++} ont différencié celui des os (embryonnaires) et, moins nettement, ceux du rein et du foie (28,108b). Celui du sarcome osseux paraît identique à celui des os normaux (29f). Divers travaux ont eu pour but de mettre en évidence des caractères propres à un constituant métallique particulier spécifique d'un organe ou d'un autre (29f, 33a-e,75,77,91); l'activabilité par un cation ou la plus grande sensibilité à un inhibiteur ont été invoquées à cet effet. Par exemple, une forte inhibition par CN^- a été considérée comme caractéristique d'une phosphatase zincique, celle par F^- l'étant d'un enzyme magnésien ou calcique. Le fondement expérimental de cette hypothèse demeure insuffisant. Par contre, les résultats acquis dans l'étude de l'affinité des phosphatases alcalines pour le β -glycérophosphate de sodium ont permis de différencier avec certitude et de caractériser les enzymes hépatique, intestinal, osseux et rénal (111a). A $pH = 9.7$ et à 37° , les valeurs respectives de la constante d'affinité de ces phosphatases K_M sont égales à 550, 200, 880, et 400 (moyennes obtenues sur de multiples préparations à partir de données ne présentant pas plus de $\pm 5\%$ d'écart). La même méthode a conduit à la caractérisation dans le sérum de la phosphatase hépatique au cours de la plupart des hyperphosphatasémies (111b).

La spécificité d'organe de la phosphatase alcaline est donc hors de doute et il est probable, en raison des différences observées dans les valeurs de K_M , qu'elle tient à la nature des apoenzymes. Toutefois, les propriétés générales de l'enzyme sont identiques quelle que soit son origine et seul leur degré, non leur nature, varie d'un tissu à l'autre. Il n'est donc pas légitime de continuer à décrire dans les traités d'enzymologie la phosphatase des os, celle du rein et celle de divers organes indépendamment, d'autant que les caractères qui leur sont attribués sont ceux de préparations brutes.

D. EFFECTEURS ET ACTIVITÉ SYNTHÉTISANTE

La formation d'esters phosphoriques par la phosphatase alcaline est l'une des réactions de synthèse enzymatique les plus caractéristiques, à telle enseigne qu'elle a pu être proposée comme expérience de cours pratiques dans divers manuels. Régie par la loi d'action de masse, elle aboutit au même équilibre final que l'hydrolyse des

constituants de l'ester (35,65) et sa spécificité est identique à celle de la réaction inverse. De très nombreux esters ont été obtenus, et la plupart isolés à l'état pur, par voie enzymatique. Ce sont les glycérophosphates, des esters de monols (méthanol, éthanol), de glycols, de polyols dérivés des hexoses, du glucose, du fructose, et d'autres oses (fructose-1 et 6-monophosphate, fructose-1,6-diphosphate, glucose-, galactose-, et mannose-6-monophosphate) (35,65,78), de la choline et de la colamine (104). La phosphorylation directe de l'amidon et du glycogène a été réalisée sans rupture de liaisons osidiques, comme dans la glycogénolyse phosphorylante; de même la réaction inverse de déphosphorylation de ces polyosides (114).

L'intérêt de la synthèse enzymatique des esters s'est surtout manifesté dans le domaine de la chimie du métabolisme, mais les faits observés dans des tissus ou dans des systèmes incomplètement définis sont toujours complexes, car ils traduisent la résultante de réactions multiples (transphosphorylations, hydrolyses phosphorylantes), étrangères à l'activité de la phosphatase, en même temps que cette dernière. Aussi seuls les travaux poursuivis à l'aide de préparations de phosphatase dépourvues de particules cellulaires peuvent-ils être retenus. L'équilibre de synthèse n'est en général atteint qu'en plusieurs jours à 37° et à des pH voisins de 8.0-8.5, l'inactivation de l'enzyme empêchant l'expérimentation en milieu plus alcalin. Par ailleurs, on ne peut pas augmenter le rendement en ester de la réaction en enrichissant les milieux en phosphates, car, au delà d'une certaine concentration en ceux-ci, l'inhibition par les ions PO_4^{--} se manifeste. C'est pourquoi l'étude des activateurs de la synthèse enzymatique des esters a été entreprise plutôt que celle de ses inhibiteurs. Les extraits bruts d'intestin, de rein se sont montrés peu sensibles aux effecteurs de l'hydrolyse et c'est seulement après purification et dialyse que ceux-ci présentent une activité sur les synthèses, parce qu'ils ne se trouvent plus alors en concurrence avec les effecteurs naturels.

La synthèse des esters dans les extraits bruts d'intestin, de foie, de rein, est sous la dépendance d'un (ou de plusieurs) effecteur naturel. Lorsque ce dernier est éliminé par dialyse à 0°, l'enzyme perd presque complètement son activité et il récupère celle-ci par addition du dialysat. La purification de la phosphatase diminue fortement la vitesse des synthèses, que l'addition du produit de la dialyse des préparations brutes permet alors d'accélérer (137a). La nature de l'effecteur naturel n'a pas pu être précisée et il est probable qu'il s'agit de substances multiples. L'addition de sels de magnésium et celle de sels de zinc (SO_4Mg 1×10^{-3} - 1×10^{-2} M et SO_4Zn 1×10^{-6} M) à la phosphatase dialysée ou purifiée par précipitation acétonique fractionnée conduit à une faible activation; de même celle d'acides aminés. L'addition simultanée de ces sels et d'alanine

($1 \times 10^{-2} M$) permet, par contre, d'augmenter très fortement la vitesse de la réaction sans modifier l'équilibre final (137b). Il avait été par ailleurs remarqué que l'autolyse des tissus réduit l'activité synthétisante de la phosphatase que l'on en extrait et que le dialysat de celle-ci est alors peu actif, ce qui rendait improbable que l'effecteur naturel soit uniquement constitué par un acide aminé ou un peptide et des cations. De plus la présence de combinaisons phosphorées dans les fractions actives du dialysat s'était manifestée. Un récent travail de Meyerhof et Green (78) explique ces faits. Les dérivés phosphoriques renfermant une liaison riche en énergie, en particulier la phosphocréatine, accélèrent la synthèse phosphatasique des esters sans modifier l'équilibre final. Il apparaît que le système activateur de ce processus décrit par Roche, Nguyen-van Thoai, et Danzas (137a) est constitué par un mélange d'effecteurs véritables (cations et peptides) et d'effecteurs apparents (donateurs de phosphate).

La participation possible de corps demeurant étrangers à l'équilibre final à la synthèse des esters est physiologiquement très importante. Du point de vue biochimique, elle permet de comprendre que, lorsque l'estérification enzymatique est rapide, on observe fréquemment que le taux des esters dépasse celui correspondant à l'équilibre, puis retourne à celui-ci. Il ne peut en effet en être ainsi que si un donateur de phosphate intervient dans une réaction autre que l'estérification directe, l'équilibre propre à celle-ci se rétablissant par l'hydrolyse de l'excès du produit initialement formé. Le caractère dynamique de cet équilibre ne se manifeste pas que dans ce phénomène. Car, non seulement la synthèse des glycérophosphates conduit à un mélange des deux isomères avec une prédominance (80%) d' α , mais l'hydrolyse du β -glycérophosphate jusqu'à l'équilibre en milieu glycérolé va de pair avec une transposition de l'ester non décomposé, dans lequel on retrouve près de 90% de dérivé (35). Ces quelques faits suffisent à montrer que l'étude de la synthèse phosphatasique offre de grandes possibilités de recherche.

IV. Sur la Constitution de la Phosphatase Alcaline

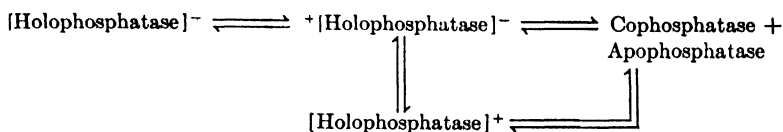
Les éléments que l'on peut tirer de l'analyse des préparations purifiées de phosphatase alcaline pour élaborer une représentation de la structure de cet enzyme et pour discuter son mécanisme d'action sont peu nombreux. Aucun coenzyme ou groupement actif ne peut

être mis en évidence sur le spectre d'absorption ultraviolette et seule une teneur élevée en magnésium des préparations intestinales et rénales les plus actives constitue un caractère particulier de leur composition. Aussi a-t-on cherché à connaître la nature de l'enzyme par d'autres méthodes d'étude, dont les résultats doivent être examinés avant de coordonner dans une hypothèse de travail l'ensemble des faits acquis.

A. DISSOCIATION ET RECONSTITUTION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE

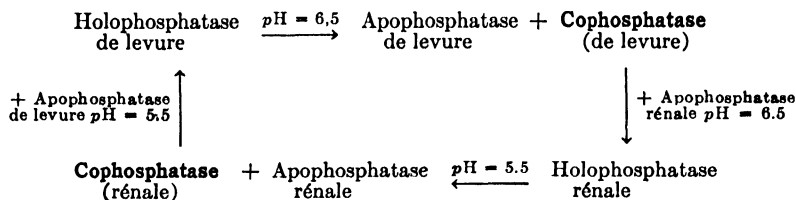
La stabilité de l'enzyme varie avec le pH de ses solutions. Alors qu'il s'inactive par dénaturation irréversible en milieu alcalin aux pH supérieurs à 8.5-9.0, son inactivation en milieu acide, à partir de $pH = 6.0$, est réversible, sauf si l'acidité du milieu a dépassé $pH = 3.0$. L'étude de ce phénomène, entreprise tout d'abord par Albers (7a), par Albers, Beyer, Bohnenkamp, et Müller (9), a conduit aux faits et aux interprétations suivantes. La conservation des solutions de phosphatase alcaline à des pH compris entre 6.0 et 3.0 provoque une inactivation progressive. Or, lorsque l'on dialyse les mêmes milieux contre des solutions tampon de ces pH , le mélange des fractions diffusible et non diffusible (protéique) restaure une activité phosphatasique dont les caractères sont identiques à ceux de l'enzyme initial. La réactivation a été réalisée aussi par addition à la fraction protéique de solution enzymatique bouillie (39a) ou de produits séparés de celle-ci par adsorption sur alumine (42). Elle ne se manifeste que lentement; elle évolue en 6 à 8 heures et n'a lieu que si le pH du mélange a été ramené à 7.0-8.0. Elle ne permet le retour à l'activité phosphatasique initiale que si celle-ci n'a pas été réduite de plus de 70% par la dialyse, et l'on n'observe qu'une restauration de 25% du pouvoir phosphoestérasique si l'inactivation a été totale (6a,9). La réactivation complète a été obtenue dans des conditions particulières (6b).

Ces résultats pouvaient être interprétés comme traduisant la dialyse d'un effecteur, mais, d'une part, la cinétique de la réactivation diffère de celle de toutes les réactions d'activation et, d'autre part, cet effecteur devrait présenter une spécificité absolue, car aucun de ceux qui sont actuellement connus ne peut le remplacer. On a, dès lors, coordonné ces faits dans l'hypothèse que résume le schéma suivant (7a):



La phosphatase alcaline serait un ampholyte stable sous la forme d'anion et à l'état isoélectrique, mais instable sous la forme de cation. Ce dernier se dissocierait en un coenzyme dialysable et un apoenzyme protéique aux *pH* inférieurs à 6.0 et l'un et l'autre se recombineraient lorsque leur mélange est porté à un *pH* compris dans la zone de stabilité de la phosphatase, entre 6.0 et 8.5.

Cette conception a été récemment reprise par Ek, von Euler, et Hahn (39a et b), par Abul-Fadl et King (2c) auxquels on doit des essais de caractérisation de la cophosphatase. Albers et ses collaborateurs l'ont étendue à la phosphatase de *pH* optimum = 4.0 des levures hautes (9), Ruffo (120), Roche, N.-v. Thoai, et Lila (116) à celle des organes animaux de *pH* optimum = 5.2. Des expériences que l'on peut considérer comme démontrant le transport de la cophosphatase sur l'apoenzyme d'une autre phosphatase préalablement dissociée ont été réalisées selon le principe suivant. Chaque type de phosphatase présente une zone de stabilité différente dans l'échelle des *pH*; on la dissocie en se plaçant en dehors de celle-ci et l'on sépare par dialyse l'apoenzyme et le coenzyme. Le mélange, à un *pH* compris dans la zone de stabilité d'une phosphatase, de l'apoenzyme de celle-ci et d'un coenzyme, provenant d'une autre phosphatase comme le sien propre, reconstitue la phosphoestérase ayant fourni la protéine. Ainsi la phosphatase rénale (*pH* optimum = 9.2) et celle des levures hautes (*pH* optimum = 4.0) ont-elles été reconstituées chacune à partir de son apoenzyme et du coenzyme de l'autre, lequel a fait l'objet du "transport" schématisé ci-dessous (9).



Pareil cycle a été réalisé à propos du transport du coenzyme de la phosphatase acide de *pH* optimum = 5.2 du foie sur l'apoenzyme

de la phosphatase alcaline (116,120), en sorte qu'il est certain que la dialyse de toutes les phosphomonoestérases à pH convenable permet de les inactiver et de recueillir à partir des unes et des autres un produit diffusible jouant vis à vis de toutes le rôle d'un coferment quelle que soit son origine. L'activité catalytique serait liée à celui-ci tandis que la spécificité de propriétés (pH optimum, effecteurs) de chaque enzyme isodyname reposerait sur son constituant protéique.

B. RÉACTIVATION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE AU MOYEN D'EFFECTEURS

L'activation par l'ion Mg^{++} a tout d'abord permis de penser que celui-ci exerce une influence sur la propriété catalytique du groupe-ment actif. Par la suite, les connaissances sur la dissociation des enzymes s'étant développées, on a recherché si des corps considérés auparavant comme des effecteurs ne sont pas, en fait, des constituants de la phosphatase. L'étude de la réactivation de celle-ci par des corps de constitution définie après élimination de fractions, encore indéterminées, de sa molécule a été à cet égard féconde.

Lorsque la phosphatase intestinale (chien) purifiée est dialysée à 37° contre de l'eau bidistillée, elle perd lentement son pouvoir glycérophosphatasique, lequel disparaît en 30 à 40 jours. Son activabilité par l'ion Mg^{++} (SO_4Mg $1 \times 10^{-2} M$) augmente en fonction de son degré d'inhibition (figure 1, § IC) (104) et il est dès lors légitime de se demander si le métal ne participe pas à la reconstitution d'un système catalytique d'où la dialyse l'a lentement éliminé, ce qu'a montré l'analyse (30). Dans les mêmes conditions Mn^{++} et Zn^{++} ajoutés chacun à sa concentration optima, produisent les mêmes effets que Mg^{++} , ceux de Ca^{++} , Co^{++} , et Ni^{++} étant moins intenses. L'action des uns et des autres ne se manifeste d'ailleurs régulièrement que si l'on a soin de ne pas pousser la dialyse au delà de l'inactivation complète de l'enzyme, car cette dernière devient alors irréversible (dénaturation). Pour Nguyen-van Thoai, Roche, et Roger (118b), les cations activateurs sont entièrement interchangeables et n'exercent leurs pleins effets qu'en la présence d'acides aminés. La phosphatase (intestin de chien) (activité initiale, $Q_p = 23,000$) totalement inhibée par 15 à 20 jours de dialyse à $pH = 5.8$ à 37° (limite de la zone de stabilité), est très faiblement réactivée ($Q_p = 3,000$) par incubation de 2 heures à $pH = 8.8$, sensiblement plus si

cette opération a été réalisée en présence de Mn^{++} et surtout de Mg^{++} ($Q_p = 11,000$). L'incubation en présence d'alanine ($1 \times 10^{-2} M$) permet une réactivation plus grande ($Q_p = 40,000$), mais l'association de l'acide aminé à des cations est beaucoup plus efficace, principalement en présence de Mn^{++} et de Mg^{++} à concentration optima ($Q_p = 170,000-180,000$).

L'étude de la réaction de réactivation a donné lieu aux observations suivantes: (1) l'acide aminé doit être incubé avec l'enzyme dialysé; son introduction dans le milieu après celle du métal et immédiatement avant celle du substrat est sans effet; (2) le métal peut, par contre, être ajouté après incubation en présence de l'acide aminé; (3) cette opération est inefficace ou moins efficace si des fluorures, des phosphates ou des pyrophosphates sont présents, alors qu'après incubation et réactivation par le couple: alanine-Mg, les fluorures et les pyrophosphates ne sont pas inhibiteurs et les phosphates ne le sont pas plus que vis à vis de l'enzyme initial. La signification de ces faits n'est pas simple. L'inactivation et la réactivation résident sans doute dans l'élimination de constituants métalliques au cours de la dialyse et dans la reconstitution ultérieure d'une métalloprotéine. On constate en effet une perte importante en magnésium au cours de la dialyse (30) et de l'électrodialyse (2c) en même temps que la phosphatase s'inactive. La nécessité de l'incubation (time reaction), commune à la réactivation de nombreux enzymes (carboxylase, arginase, leucylpeptidases, tyrosine-décarboxylase) peut être reliée soit à la réversion de processus de dénaturation, soit à la formation d'une combinaison indispensable à la participation ultérieure du métal à un complexe. Aucune réponse précise ne peut encore être faite en faveur de l'une ou de l'autre hypothèse. Quant à la nature du métal activateur, dans le cadre de ceux étudiés jusqu'ici, elle offre une remarquable absence de spécificité lorsque l'on a soin d'opérer l'incubation en présence du couple: alanine-cation. Seules les concentrations optima en sel changent, probablement en raison de l'inégale affinité de la protéine pour chacun des divers cations: la réactivité maxima a été atteinte, dans le cas cité plus haut, avec 12 mg. Mg, 4 mg. Ca, 0.54 mg. Mn et 0.065 μ g. Fe ou Zn pour 60 μ g. de protéine. Ajoutons que la nécessité d'opérer une incubation en présence d'un acide aminé pour faire réapparaître l'activité enzymatique doit être rapprochée du fait que la réactivation de "l'apophosphatase" par la "cophosphatase" séparée par dialyse n'est pas instantanée, mais exige plusieurs heures de contact à un pH favorable (7a,9).

De toute manière, un ensemble d'expériences montre que la protéine enzymatique, inactivée par dialyse, redevient apte à opérer l'hydrolyse phosphatasique après addition d'un cation, entre autres de Mg^{++} , et d'un acide aminé (alanine) à concentrations convenables. Il en découle que, si l'on doit considérer qu'elle ne constituait plus alors que l'apophosphatase, le rôle de la cophosphatase pourrait être tenu par le couple: acide aminé-cation.

C. HYPOTHÈSES SUR LA CONSTITUTION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE

Comme pour tout enzyme les problèmes posés par la structure de la phosphatase sont nécessairement liés à ceux posés par son mode d'action. Or, les travaux de Bamann et de ses élèves ont apporté à l'étude de celui-ci une contribution d'un haut intérêt en décrivant des "modèles de phosphatase" de composition connue. Dans une première série de recherches Bamann (16), puis Bamann et Meisenheimer (20b) ont établi que les hydroxydes colloïdaux de multiples métaux dédoublent les glycérophosphates en milieu faiblement alcalin, à un pH optimum voisin de 9.0 dont l'existence est sans doute liée à la dissolution et à la floculation des hydroxydes. Ceux de multiples terres rares, du cérium, du néodyme, du praséodyme, de l'yttrium, du thorium, du zirconium, sont les plus actifs; ceux du manganèse, du fer, des alcalino-terreux le sont peu. Nous avons pu confirmer ces faits. Bamann et Nowotny (21) leur ont récemment apporté un complément. Ils ont montré que le β -glycéro-

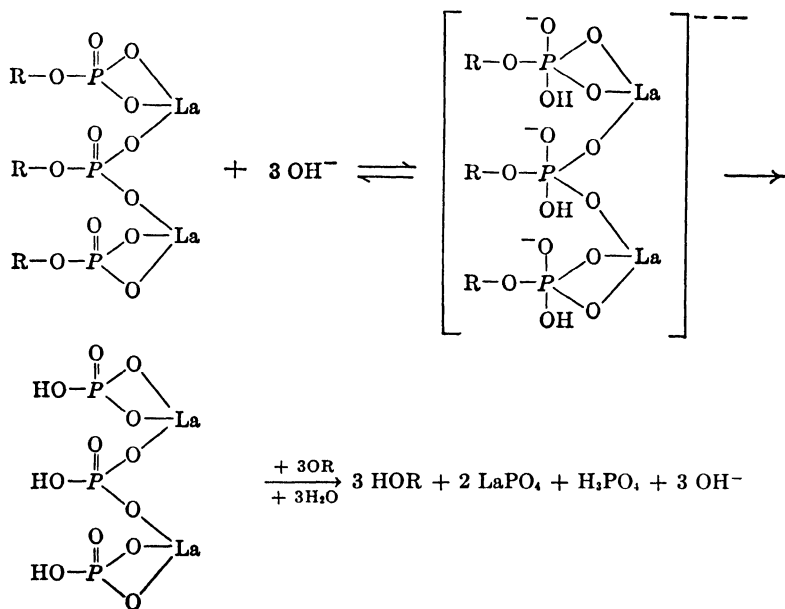


SCHÉMA I (21)

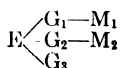
phosphate de lanthane en suspension aqueuse s'hydrolyse spontanément à $pH = 9.5$ et à 37° (13.5–19.1% en 1 jour, 35.6–46.2% en 5 jours), dans des conditions où les glycérophosphates alcalins ou alcalino-terreux sont stables. Le métal serait l'agent de cette autocatalyse car "la formation du sel rend instable la liaison ester dans la molécule" et "l'induction" (21a) de l'hydrolyse s'opérerait selon le schéma I.

Cette interprétation illustre un mécanisme possible de la catalyse phosphatasique envisagée comme mettant en jeu des valences primaires (*Hauptvalenzkatalyse*). Elle rejoint l'une des hypothèses faites pour expliquer le mécanisme de l'activation par le magnésium, laquelle apparait comme de même nature que celle due aux autres cations divalents. L'action de Mg^{++} a tout d'abord été considérée comme indirecte et due à une protection contre l'inhibition par les phosphates libérés au cours des hydrolyses enzymatiques (33a,41,57). Elle a par ailleurs été rattachée à la formation d'un complexe actif: enzyme-magnésium (63) et l'une des opinions émises pour expliquer le rôle de celui-ci dans la catalyse phosphatasique est la suivante. L'activation du substrat S s'opérerait par combinaison avec le magnésium, le composé $-SMg^+$ donnant avec l'enzyme E un composé facilement dissociable $+E \cdot Mg \cdot S^-$ (26). En outre il a été observé que la phosphatase intestinale présente à $pH 9.2$ une augmentation de son affinité pour le substrat quand on enrichit en magnésium son milieu d'action (112a) et qu'elle s'unit aux esters à l'état de molécule non dissociée (66). Un ensemble de faits apporte donc une présomption en faveur de la participation d'un métal à la catalyse enzymatique et l'on a été conduit à admettre que la phosphatase alcaline est une métalloprotéine.

Nous avons à diverses reprises signalé la présence de magnésium et de traces de zinc dans les préparations des enzymes intestinal et rénal, en sorte que le premier de ces métaux a souvent été considéré comme le constituant minéral de la phosphatase (33a,41,63,75). Toutefois, de nombreux auteurs ont conclu de l'activation par d'autres cations que Mg^{++} que l'enzyme renferme du zinc (77,91), du manganèse ou du cobalt (33c,d,e) dans certaines cellules. La même déduction a paru légitime pour expliquer la diversité d'action des cyanures et des fluorures dans les extraits de différents organes (75). L'interchangeabilité des cations divalents en tant qu'agents de réactivation de l'enzyme totalement inhibé par dialyse n'est pas en

faveur du rôle spécifique de divers métaux en tant que constituants d'enzymes particuliers, ni même de la diversité de ceux-ci dans les phosphatases de différents tissus. Autant il est expérimentalement possible de remplacer le magnésium dans la carboxylase de levure par d'autres cations divalents lorsque l'on reconstitue cet enzyme à partir de sa protéine spécifique, de la cocarboxylase et de Mg^{++} , ou de Co^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} , autant l'enzyme naturel ne renferme-t-il jamais que le premier de ceux-ci. En fait, le magnésium paraît être le constituant minéral de la phosphatase alcaline des tissus animaux; il est possible qu'il y soit partiellement ou totalement remplacé dans certaines conditions par le zinc ou le manganèse, le premier paraissant être présent dans certaines préparations bactériennes. Il est par ailleurs peu probable que la spécificité d'organe de la phosphatase alcaline tienne à son constituant métallique; elle relève plutôt de protéines spécifiques.

Une conception plus complexe a été élaborée par Cloetens (33c,d,e) et ne nous semble pas mériter de conserver la faveur dont elle jouit encore, malgré les critiques formulées à son égard (118b). Selon cette théorie, l'apoenzyme E serait porteur de trois groupements actifs G_1 , G_2 , et G_3 (pouvant aussi être fixés à un même coenzyme). Pour que la phosphatase soit active, G_1 et G_2 doivent être unis à deux métaux M_1 et M_2 . Quant à G_3 , libre dans l'enzyme purifié, sa combinaison à un métal M_3 provoque l'inhibition et le schéma suivant représenterait la phosphatase alcaline:



M_1 se détacherait par dialyse contre CO_2NaH , avec perte progressive de l'activité enzymatique (jusqu'à 98%); il pourrait être remplacé par Mg^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} , Ni^{++} , et Co^{++} , tous réactivateurs. M_2 ne pourrait être éliminé que par dialyse contre KCN $1 \times 10^{-2} M$ à $pH = 9.0$, avec inactivation partielle, réversible par addition de Zn^{++} , Co^{++} , et Hg^{++} . Lorsque M_2 a été éliminé, la fixation de M_1 sur G_2 provoque une inhibition et deux métaux seraient nécessairement présents, chacun dans un groupement actif particulier, l'existence d'une concentration optima d'effecteur métallique s'expliquant soit par le blocage de G_1 et de G_2 par un même métal, soit par la fixation de celui-ci sur G_3 . Or, si ce mode de représentation est compatible avec de nombreux faits observés sur des préparations non purifiées, il ne l'est pas avec la réactivation, au moyen d'un seul cation de l'enzyme totalement inactivé par dialyse, opération qui conduit à l'obtention d'activités enzymatiques beaucoup plus grandes que celles existant au début de l'expérience (118b). Le principal argument sur lequel repose la théorie de la nécessité de deux métaux (magnésium et zinc pour l'enzyme rénal) pour assurer la catalyse phosphatasique est la suivante. La phosphatase rénale dialysée six jours à $pH = 9.0$ contre KCN $1 \times 10^{-2} M$ à 0° , puis quatre contre CO_2NaH

$2 \times 10^{-2} M$ n'est presque pas réactivable par Mg^{++} , mais le devient si elle a été au préalable incubée en présence de Zn^{++} , très peu actif par lui même. En réalité, l'élimination de CN^- fixé à une protéine est totale uniquement après de très longues dialyses et il est probable que l'observation de Cloetens traduit seulement une antiinhibition par la zinc, le cobalt ou le mercure. Elle peut en effet être répétée dans les conditions décrites par lui, mais non après une dialyse de durée plus longue; un seul cation en présence d'un acide aminé, à concentration convenable de l'un et de l'autre suffit alors à réactiver l'enzyme au maximum.

La dissociation d'un constituant métallique de la phosphatase alcaline ne peut, à elle seule, expliquer son inactivation par dialyse ou électrodialyse, et par adsorption et la question de l'existence d'un coenzyme organique s'est logiquement posée. La fraction coenzymatique séparée par Albers et ses collaborateurs au moyen de la dialyse en dehors de la zone de stabilité (9), celle obtenue par von Euler et Fonó (42) au moyen de l'adsorption sur alumine ou dans des préparations inactivées par ébullition, renferment un constituant actif en tant que réactivateur de l'apoenzyme, mais dont les cendres sont inefficaces. Le fractionnement de ce produit par ultracentrifugation a permis de localiser son constituant actif dans une molécule de poids moléculaire compris entre 500 et 1500 (valeur moyenne adoptée: 900) et il est possible que celui-ci soit un hexapeptide (39b). A la vérité c'est seulement en raisonnant par analogie avec la substitution de peptides ou d'acides aminés au produit organique naturel que cette dernière hypothèse a pu être émise. Le fait que la substance active est stable à ébullition entre $pH = 1.5$ et 13.0 est plutôt en faveur de l'existence d'une molécule plus simple.

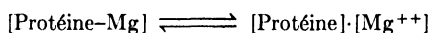
Les effets du "coenzyme" ne se manifestant intensément qu'en la présence d'un cation divalent, entre autres de Mg^{++} , il était important de suivre l'inactivation et la réactivation de la phosphatase en fonction des deux constituants auxquels on pouvait rattacher le pouvoir phosphatasique des préparations. Abul-Fadl et King (2c) ont constaté que la teneur en azote protéique des préparations de phosphatase rénale demeure constante pendant les 15 premières heures d'électrodialyse, puis diminue progressivement jusqu'à une valeur pratiquement fixe; atteinte en 34 heures. L'activité enzymatique diminue faiblement pendant la première période et devient peu à peu très minime vers la trentième heure. La réactivation par Mg^{++} , constante jusque vers la 16ème heure, disparaît peu à peu; elle ne se manifeste plus après 30-36 heures. Le liquide du compartiment anodique de l'électrodialyseur est à cet égard inefficace. Celui du compartiment cathodique est seul actif, surtout en présence d'acétate de magnésium $1 \times 10^{-2} M$; son extrait sec renferme 15% de cendres riches en magnésium, mais dépourvues de zinc et de calcium et les produits organiques présents sont très riches en azote (20% environ). La dialyse prolongée contre eau bidistillée a donné des

résultats identiques en ce qui concerne la phosphatase intestinale, laquelle perd une partie importante de son magnésium et de son azote en même temps qu'elle s'inactive (30,105, et données inédites). Néanmoins, il est certain que la totalité du magnésium présent n'est pas directement liée à l'activité phosphatasique, car, d'une part, la fraction non dialysable en renferme encore au moment de son inactivation totale (réversible par addition du dialysat) et, d'autre part, le rapport entre la teneur en magnésium et le pouvoir hydrolysant des préparations purifiées n'est pas constant.

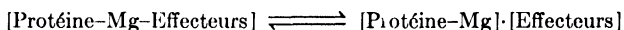
La coordination la plus satisfaisante de ces diverses observations paraît être la suivante. L'hypothèse initialement formulée par Albers et ses collaborateurs (9), à savoir que la réactivation de l'enzyme à partir de ses produits de dissociation (protéine et dialysat) correspond à sa reconstitution n'est pas illogique. Dès lors, trois éléments peuvent être associés dans la molécule de phosphatase alcaline: une protéine, un métal divalent, et un corps organique de faible poids moléculaire paraissant être un peptide ou un acide aminé: la première est rigoureusement spécifique, le métal et le corps organique sont au contraire remplaçables, l'un par divers cations, l'autre par des acides aminés ou des peptides multiples. Le problème dont la solution doit être recherchée est le mode de combinaison de ces trois éléments dans la molécule de phosphatase et leur rôle respectif dans la catalyse. Il peut être envisagé à partir de nos connaissances sur d'autres enzymes à métal dissociable (*cf.* 102d). Dans le cas de la carboxylase des levures, l'apoenzyme et le coenzyme organique sont rigoureusement spécifiques et le métal naturel (Mg) est remplaçable par divers cations divalents (Kubowitz et Lüttgens, 69; Green, Herbert, et Subrahmanyam, 52); le groupement actif est alors porté par l'aneurinediphosphate et le métal participerait à la combinaison de l'apoenzyme au coenzyme. Le cas de l'arginase hépatique est, comme celui des peptidases (74), sans doute plus voisin de celui de la phosphatase alcaline. Le manganèse, constituant naturel de l'arginase (Edlbacher *et al.*), peut en être réversiblement dissocié et, par ailleurs, être remplacé par d'autres métaux divalents; mais aucune coarginase spécifique n'a pu être mise en évidence. L'étude de la combinaison de l'enzyme au substrat a conduit Richards et Hellermann (98), Roche et Mourgue (110) à admettre que le manganèse jouait un rôle dans la fixation du substrat à l'enzyme dans une position le rendant accessible au groupement actif, doué seul de pouvoir catalytique et appartenant à l'apoenzyme. L'interchangeabilité du métal et de l'acide aminé (ou du peptide) qui réactivent la

phosphatase totalement inhibée par dialyse nous a longtemps paru impliquer que ni l'un, ni l'autre ne participent au groupement actif. Le récent travail de Bamann et Nowotny (21) rend plausible le fait que le premier soit, au contraire, important à cet égard, la catalyse étant liée à sa combinaison au substrat. L'hydroxyde de ce métal et de ceux qui réactivent l'enzyme est pratiquement inactif au regard de celui des terres rares, mais le pouvoir catalytique des métaux présents dans les enzymes est toujours lié à leur combinaison dans une molécule organique.

L'étude de la dissociation réversible de la phosphatase et celle de son activation et de son inhibition suggèrent que le métal y est compris dans un complexe dissociable auquel participent des groupements aminés de l'apoenzyme. L'existence de ce complexe serait liée à l'équilibre:



dont la position et celle des équilibres avec de multiples effecteurs:



régieraient l'activité phosphatasique dans les cellules. Il ne semble pas que l'on doive attribuer le rôle de coenzyme, c'est à dire de support du groupement actif, aux produits organiques dissociables, ni à ceux susceptibles de les remplacer; les uns et les autres n'interviennent sans doute dans les processus de réactivation que pour reconstituer un complexe métallique dans lequel ils sont associés à l'apoenzyme. Tout se passe comme si la protéine spécifique, une fois libérée de sa combinaison magnésienne par dialyse, était alors assez instable et perdait lentement un fragment peptidique, antérieurement combiné au métal dans le complexe. La reconstitution de celui-ci pourrait avoir lieu indifféremment avec la totalité de ses éléments naturels ou avec un apoenzyme incomplet et des acides aminés ou des peptides quelconques, à condition que la position du métal par rapport à certains groupements de l'apoenzyme demeure la même. Il n'existerait pas alors de coenzyme organique, l'activité catalytique étant dévolue au magnésium au sein d'un complexe dont la structure de la protéine enzymatique déterminerait les propriétés.

V. Conclusions Générales

L'exposé d'une partie de la biochimie de la phosphatase alcaline suffit à montrer combien de problèmes demeurent ouverts dans l'étude

de cet enzyme. Celle-ci ne saurait progresser qu'en tenant compte de la nécessité d'opérer sur des produits aussi purifiés que possible pour que l'interprétation de ses résultats soit claire; l'ère de l'étude descriptive des extraits de tissus doués d'activité phosphatases est révolue. Le plus urgent des buts à atteindre est la préparation de l'enzyme pur, sans laquelle rien de définitif ne sera établi en matière de composition—et aussi sans doute de structure—de l'enzyme. Mais les recherches consacrées à la phosphatase alcaline ne présentent pas qu'un intérêt limité à cette phosphomonoestérase. Elles font nécessairement partie d'un ensemble portant sur les diverses phosphatases et, par là même, sur le problème de la nature de l'activité phosphatasique et des facteurs qui déterminent ses modalités (spécificité de pH optimum des diverses phosphatases isodynamos, spécificité de substrat). A cet égard le "transport de cofermant" hypothétique (9) demeure inexplicé. Il est peu probable que l'on doive admettre (7b) qu'il existe un équilibre cellulaire entre les divers apoenzymes des phosphatases alcaline et acides et une cophosphatase unique, mais le problème d'un mécanisme général de l'activation des phosphatases isodynamos doit être considéré comme posé par les faits observés. Enfin, l'étude de la phosphatase alcaline est susceptible d'avoir une portée plus générale encore, car ses résultats n'ont leur pleine signification que dans le cadre de la biochimie des enzymes à métal dissociable, dont l'importance croît sans cesse depuis le premier travail que leur ont consacré Warburg et Sakuma (145).

Bibliographie*

1. Abul-Fadl, M. A. M., et King, E. J., *J. Clin. Path.*, **1**, 80 (1948).
2. Abul-Fadl, M. A. M., et King, E. J., *Biochem. J.* (a) **44**, 431 (1949).
(b) **44**, 434 (1949). (c) **44**, 435 (1949).
3. Abul-Fadl, M. A. M., King, E. J., Roche, J., et Thoai, Nguyen-van, *Biochem. J.*, **44**, 428 (1949).
4. Aebi, H., *Helv. Chim. Acta*, **32**, 464 (1949).
5. Aebi, H., et Abelin, I., *Helv. Chim. Acta*, **31**, 1943 (1948).
6. Albers, D., *Z. physiol. Chem.* (a) **261**, 43 (1939). (b) **261**, 269 (1939).
(c) **265**, 129 (1940). (d) **266**, 1 (1940); (e) *Biochem. Z.*, **306**, 143 (1940).

* L'indication: *Bull. soc. chim. biol. (Trav.)* concerne la partie du *Bulletin de la société de chimie biologique* éditée pendant la période de guerre en zone Sud de la France. Ce périodique a paru avec la même tomanion que le Bulletin, sous le nom de Travaux des Membres de la Société de Chimie Biologique; l'indication bibliographique donnée est celle adoptée dans les périodiques d'analyses.

7. Albers, H. (a) *Z. angew. Chem.*, **49**, 448 (1936). (b) In F. F. Nord et R. Weidenhagen, *Handbuch der Enzymologie*, Vol. I, Akadem. Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1940, p. 408.
8. Albers, H., et Albers, E., *Z. physiol. Chem.*, **232**, 165 (1935).
9. Albers, H., Beyer, E., Bohnenkamp, A., et Müller, G., *Ber.*, **71**, 1913 (1938).
10. Anagnostopoulos, C., *Biochim. et Biophys. Acta*, **3** (1949) sous presse.
11. Armstrong, A. R., et Horton, E., *Proc. Roy. Soc. London*, **B85**, 109 (1912).
12. Asakawa, K., *J. Biochem. Japan*. (a) **10**, 157 (1928). (b) **11**, 143 (1930).
13. Baccari, V., *Boll. soc. ital. biol. sper.* (a) **20**, 397 (1945). (b) **20**, 398 (1945). (c) **22**, 48 (1946).
14. Bailey, K., *Biochem. J.*, **36**, 121 (1942).
15. Bakwin, H., et Bodansky, O., *J. Biol. Chem.*, **101**, 641 (1933).
16. Bamann, E., *Z. angew. Chem.*, **52**, 186 (1939).
17. Bamann, E., et Diederichs, K., *Ber.*, **67**, 2019 (1934).
18. Bamann, E., et Heumüller, E., *Naturwissenschaften*, **28**, 555 (1940).
19. Bamann, E., Heumüller, E., Werner, H., et Carl, A., cité d'après (20).
20. Bamann, E., et Meisenheimer, M. (a) In Bamann, E., et Myrbäck, K., *Methoden der Fermentforschung*, Vol. II, Thieme, Leipzig, 1941, p. 1621. (b) *Ber.*, **71**, 1711, 1980, 2086, 2233 (1938).
21. Bamann, E., et Nowotny, E., *Ber.*, **81**, 451, 455, 463 (1948). (a) *Ibid.*, p. 456.
22. Bamann, E., et Riedel, E., *Z. physiol. Chem.*, **229**, 125 (1934).
23. Bamann, E., Riedel, E., et Diederichs, K., *Z. physiol. Chem.*, **230**, 175 (1934).
24. Bamann, E., et Salzer, W., *Ber.*, **70**, 1263 (1937).
25. Barron, E. S. G., et Singer, T. P., *J. Biol. Chem.*, **157**, 221 (1945).
26. Bauer, E., *Z. physiol. Chem.*, **248**, 213 (1937).
27. Bauer, E., Schäffner, A., et Krume, F., *Z. physiol. Chem.*, **237**, 191 (1935).
28. Belfanti, S., Contardi, A., et Ercoli, A., *Biochem. J.* (a) **29**, 517 (1935). (b) **29**, 834 (1935). (c) **29**, 1491 (1935).
29. Bodansky, O., *J. Biol. Chem.* (a) **114**, 273 (1936). (b) **115**, 101 (1936). (c) **118**, 341 (1937). (d) **165**, 605 (1946). (e) **174**, 465 (1947). (f) **179**, 71 (1949).
30. Bouchilloux, S., Derrien, Y., Roche, J., et Roger, M., *Bull. soc. chim. biol.*, **30**, 417 (1948).
31. Caputto, R., et Marsal, A. (a) *Rev. argent. soc. biol.*, **17**, 139 (1941). (b) *Rev. facultad cienc. méd. univ. Córdoba*, **1944**, 1.
- 32a. Cedrangolo, F., *Enzymologia*, **6**, 72 (1939).
- 32b. Cedrangolo, F., et Ruffo, A., *Arch. sci. biol. Italy*, **24**, 59 (1939).
33. Cloetens, R., *Enzymologia*: (a) **6**, 46 (1939), (b) **7**, 157 (1939). *Biochem. Z.*: (c) **307**, 353 (1941), (d) **308**, 37 (1941), (e) **310**, 42 (1941).
34. Courtois, J., *Compt. rend.*, **199**, 1252 (1934).
35. Courtois J., *Thèse Doct. Sc. phys.*, Paris, 1938, 1 vol., 215 pp.
36. Dawson, E. R., *Biochem. J.*, **21**, 398 (1927).
37. Delory, G. E., et King, E. J., *Biochem. J.*, **37**, 547 (1943).
- 37a. de Duve, C., Berthet, J., Hiers, H. G., et Dupret, L., *Bull. soc. chim. biol.*, **31**, 1242 (1949).
38. Edlbacher, S., et Kutscher, W., *Z. physiol. Chem.*, **207**, 1 (1932).
39. Ek, B., Euler, H. von, et Hahn, L. (a) *Arkiv Kemi Mineral. Geol.*, **A26**, No. 9 (1948). (b) *Arkiv Kemi*, **1**, 117 (1949).
40. Engelhardt, V. A., et Lyubimova, M. N., *Biokhimiya*, **7**, 203 (1942).
41. Erdtmann, E., *Z. physiol. Chem.*, **177**, 231 (1928).
42. Euler, H. von, et Fonó, A., *Arkiv Kemi Mineral. Geol.*, **A25**, No. 15 (1947).

43. Euler, H. von, et Myrbäck, K., *Z. physiol. Chem.*, **125**, 297 (1922).
44. Feinstein, R. M., et Volk, M. E., *J. Biol. Chem.*, **177**, 399 (1949).
45. Fleischhacker, H. H., *J. Mental Sci.*, **84**, 947 (1939).
46. Fleury, P., et Courtois, J., *Biochim. et Biophys. Acta.* (a) **1**, 256 (1947).
(b) **3**, 256, 270 (1947).
47. Folley, S. J., et Kay, H. D., *Ergeb. Enzymforsch.*, **5**, 159 (1936).
48. Fromageot, C., *Ergeb. Enzymforsch.*, **7**, 50 (1938).
49. Giri, K. V., *Biochem. J.*, **33**, 309 (1939).
50. Gomori, G. (a) *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **42**, 23 (1939); (b) *J. Biol. Chem.*, **148**, 139 (1943).
51. Gould, B. S., *J. Biol. Chem.*, **156**, 365 (1944).
52. Green, D. E., Herbert, D., et Subrahmanyam, V., *J. Biol. Chem.*, **134**, 425 (1940).
53. Greenstein, J. P., *J. Natl. Cancer Inst.*, **2**, 511 (1942).
54. Gulland, J. M., et Jackson, E. R., *Biochem. J.*, **32**, 597 (1938).
55. Heymann, W., *Monatschr. Kinderheilk.*, **48**, 14 (1930).
56. Hoffman-Ostenhof, O., Moser, H., et Putz, E., *Experientia*, **4**, 352 (1948).
57. Holmberg, C. G., *Biochem. Z.*, **279**, 145 (1935).
58. Horiuchi, K., *J. Biochem. Japan*, **14**, 163 (1931).
59. Hotta, R., *J. Biochem. Japan*, **20**, 343 (1934).
60. Hove, E., Elvehjem, C. A., et Hart, E. B., *J. Biol. Chem.*, **134**, 425 (1940).
61. Iwatasuru, R., *Biochem. Z.*, **173**, 348 (1926).
62. Jacobsen, E., *Biochem. Z.*, **249**, 21 (1932).
63. Jenner, H. D., et Kay, H. D., *J. Biol. Chem.*, **93**, 733 (1931).
64. Kabat, E. A., *Science*, **93**, 43 (1941).
65. Kay, H. D., *Biochem. J.* (a) **20**, 791 (1926). (b) **22**, 855 (1928); *Physiol. Revs.*, **12**, 388 (1932).
66. King, E. J., et Delory, G. E., *Biochem. J.* (a) **32**, 1157 (1938). (b) **33**, 1185 (1939).
67. Köster, H., et Bersin, T., *Z. physiol. Chem.*, **321**, 153 (1933).
68. Kramer, E., Weil, L., Janigen, E. G., et Allen, M. T., *J. Franklin Inst.*, **232**, 587 (1941).
69. Kubowitz, F., et Lüttgens, W., *Biochem. Z.*, **307**, 170 (1941).
70. Levene, P. A., et Dillon, R. T., *J. Biol. Chem.*, **88**, 753 (1930).
71. Lohmann, K., *Biochem. Z.*, **262**, 157 (1933).
72. MacFarlane, M., Patterson, L. B., et Robison, R., *Biochem. J.*, **28**, 720 (1934).
73. Martland, M., et Robison, R., *Biochem. J.*, **23**, 237 (1929).
74. Maschmann, E., *Biochem. Z.*, **307**, 1 (1940).
75. Massart, L., et Dufait, R., *Z. physiol. Chem.*, **272**, 157 (1942).
76. Massart, L., et Vandendriessche, L. (a) *Naturwissenschaften*, **28**, 142 (1940). (b) *Enzymologia*, **11**, 261 (1945).
77. Menten, M. L., et Janouch, M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **63**, 33 (1946).
78. Meyerhof, O., et Green, H., *J. Biol. Chem.*, **178**, 655 (1949).
79. Monche, J., Jimenès-Vargas, J., et Sols, A., *Rev. españ. fisiol.*, **3**, 289 (1947).
80. Moog, F., *Biol. Revs. Cambridge Phil. Soc.*, **21**, 41 (1946).
81. Morii, M., *Arb. anat. Inst. kaiser. Univ. Kyoto, Abt. III*, **1**, No. 4, 16 (1933).
82. Munemura, S., *J. Biochem. Japan*, **17**, 343 (1933).
83. Neuberger, C., et Jacobsohn, K. P., *Biochem. Z.* (a) **171**, 485 (1926). (b) **199**, 498 (1928).
84. Neuberger, C., Jacobsohn, K. P., et Wagner, J., *Biochem. Z.*, **188**, 227 (1927).
85. Neuberger, C., et Schuchardt, W., *Enzymologia*, **1**, 39 (1936).

86. Ochoai, E., *Biochem. Z.*, **253**, 185 (1932).
87. Ohmori, Y., *Enzymologia*, **4**, 217 (1937).
88. Paget, M., et Vittu, C., *Compt. rend.* (a) **223**, 216 (1946). (b) **224**, 864 (1947). (c) *Compt. rend. soc. biol.*, **143**, 405 (1949).
89. Patwardhan, V. N., *Biochem. J.*, **31**, 560 (1937).
90. Perlmann, G. E., et Ferry, R. M., *J. Biol. Chem.*, **142**, 513 (1942).
91. Pett, L. B., et Wynne, A. M., *Biochem. J.* (a) **27**, 1660 (1933). (b) **28**, 365 (1934). (c) **32**, 563 (1938).
92. Pfankuch, E., *Z. physiol. Chem.*, **241**, 34 (1936).
93. Pillar, R. K., *Biochem. J.*, **32**, 1087 (1938).
94. Plimmer, R. H., *Biochem. J.*, **7**, 43 (1923).
95. Quagliariello, G., *Comm. pontif. Acad. Sci.*, **7**, 4151 (1943).
- 95a. Rabate, J., et Courtois, J., *Bull. soc. chim. biol.*, **23**, 190 (1941).
96. Regno, F. del, *Arch. sci. biol. Italy*, **24**, 532 (1938).
97. Reis, J., *Bull. soc. chim. biol.* (a) **16**, 385 (1934). (b) *Enzymologia*, **2**, 110 (1932).
98. Richards, M. M., et Hellerman, L., *J. Biol. Chem.*, **134**, 237 (1940).
99. Rimington, C., *Biochem. J.* (a) **21**, 272 (1927). (b) **21**, 1179 (1927). (c) **21**, 1186 (1927).
100. Rimington, C., et Kay, H. D., *Biochem. J.*, **20**, 777 (1926).
101. Robison, R. (a) *Biochem. J.*, **17**, 286 (1923). (b) *Ergebn. Enzymforsch.*, **7**, 280 (1932).
102. Roche, J. (a) *Bull. soc. chim. biol.*, **13**, 841 (1931). (b) *Biochem. J.*, **25**, 1724 (1931). (c) *Helv. Chim. Acta*, **29**, 1253 (1946). (d) *Exposés ann. biochim. méd.*, **6**, 93 (1946). (e) *Ann. de la nutrition et de l'alim.*, **1**, 3 (1947).
103. Roche, J., et Abul-Fadl, M. A. M., *Bull. soc. chim. biol.*, **30**, 427 (1948).
104. Roche, J., et Bouchilloux, S., *Arch. des sci. physiol.*, **2**, 283 (1948)
105. Roche, J., Bouchilloux, S., et Roger, M., *Compt. rend. soc. biol.*, **142**, 1144 (1948).
106. Roche, J., et Courtois, J., *Exposés ann. biochim. méd.*, **4**, 221 (1943).
- *107. Roche, J., Danzas, E., et Thoai, Nguyen-van, *Bull. soc. chim. biol. (Trav.)*, **26**, 1153 (1944).
- *108. Roche, J., Laromiguière, S. de, et Laurens, A., *Bull. soc. chim. biol. (Trav.)* (a) **25**, 1019 (1943). (b) **25**, 1157 (1943).
109. Roche, J., et Latreille, M., *Enzymologia*, **3**, 75 (1937).
110. Roche, J., et Mourgue, M., *Bull. soc. chim. biol.*, **29**, 889 (1947).
111. Roche, J., et Sarles, H., (a) *Compt. rend. soc. biol.*, **142**, 917 (1948). (b) *Bull. acad. méd. Paris*, **133**, 415 (1949).
112. Roche, J., et Thoai, Nguyen-van, (a) *Bull. soc. chim. biol. (Trav.)*, **24**, 1237 (1942). (b) **25**, 1365 (1943).
113. Roche, J., Thoai, Nguyen-van, et Bai, Nguyen-Kim, *Compt. rend. soc. biol.*, **141**, 509 (1947).
114. Roche, J., Thoai, Nguyen-van, Danzas, E., et Silhol-Bernère, M., *Arch. des sci. physiol.* **1**, 81 (1947).
- *115. Roche, J., Thoai, Nguyen-van, et Durand, J., *Bull. soc. chim. biol. (Trav.)*, **25**, 1166 (1943).
116. Roche, J., Thoai, Nguyen-van, et Michel-Lila, O., *Compt. rend.*, **218**, 249 (1944).
- *117. Roche, J., Thoai, Nguyen-van, et Milhau, O., *Bull. soc. chim. biol. (Trav.)*, **25**, 1217 (1943).

- *118. Roche, J., Thoai, Nguyen-van, et Roger, M., (a) *Bull. soc. chim. biol. (Trav.)*, **26**, 1047 (1944). (b) *Biochem. et Biophys. Acta*, **1**, 61 (1947).
119. Rockwood, E. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **45**, 2678 (1923).
120. Ruffo, A., *Boll. soc. ital. biol. sper.*, **19**, 9 (1944).
121. Sarles, H., *Compt. rend. soc. biol.*, **141**, 1071 (1947).
122. Schöffner, A., in Bamann, E., et Myrbäck, K., *Methoden der Fermentforschung*, Vol. II, G. Thieme, ed., Leipzig, 1941, p. 944.
123. Schöffner, A., et Bauer, E., *Z. physiol. Chem.*, **232**, 64 (1935).
124. Schöffner, A., Bauer, E., et Krumei, F., *Z. physiol. Chem.*, **243**, 149 (1936).
125. Schöffner, A., et Krumei, F., *Z. physiol. Chem.*, **255**, 145 (1938).
126. Schmidt, G., et Tannhäuser, S. J., *J. Biol. Chem.*, **149**, 369 (1943).
127. Schuchardt, W., *Biochem. Z.*, **278**, 164 (1935).
128. Sherman, H. C., et Walker, F., *J. Am. Chem. Soc.*, **45**, 1960 (1923).
129. Sizer, J. W., *J. Biol. Chem.*, **145**, 405 (1942).
130. Smith, E. L., et Bergmann, M., *J. Biol. Chem.*, **140**, 445 (1941).
131. Sols, A., *Rev. españ. fisiol.*, (a) **3**, 67 (1947). (b) **5**, 59 (1949).
132. Takamatsu, H., *Trans. Soc. Path. Japonaise*, **29**, 492 (1939).
133. Tannhäuser, S. J., Reichel, M., et Grattan, J. F., *J. Biol. Chem.*, **121**, 697 (1937).
134. Tannhäuser, S. J., Reichel, M., Grattan, J. F., et Maddock, S. J., *J. Biol. Chem.*, **121**, 721 (1937).
135. Thoai, Nguyen-van, *Thèse Doct. Sc. Nat., Marseille*, 1946, 1 vol., 181 p.
136. Thoai, Nguyen-van, et Raymond, J., *Compt. rend. soc. biol.*, **139**, 814 (1945).
*137. Thoai, Nguyen-van, Roche, J., et Danzas, E. (a) *Bull. soc. chim. biol. (Trav.)*, **26**, 1139 (1944). (b) *Bull. soc. chim. biol.*, **27**, 401 (1945).
138. Thoai, Nguyen-van, Roche, J., et Sartori, L., *Compt. rend. soc. biol.* (a) **138**, 46 (1944). (b) **138**, 47 (1944).
139. Uzawa, S., *J. Biochem. Japan*, **15**, 1, 11, 19 (1932).
140. Waldschmidt-Leitz, E., et Mayer, K., *Z. physiol. Chem.*, **236**, 268 (1935).
141. Waldschmidt-Leitz, E., Samec, M., et Mayer, K., *Z. physiol. Chem.*, **250**, 192 (1937).
142. Waldschmidt-Leitz, E., Scharikova, A., et Schöffner, A., *Z. physiol. Chem.*, **214**, 75 (1932).
143. Walsch, O. F., et Walsch, G., *Nature*, **161**, 976 (1948).
144. Warburg, O., et Christian, W., *Biochem. Z.*, **314**, 148 (1943).
145. Warburg, O., et Sakuma, S., *Arch. ges. Physiol. Pflügers*, **200**, 263 (1923).
146. Williams, H. L., et Watson, E. M., *J. Biol. Chem.*, **135**, 337 (1940).
147. Willstätter, R., et Memmen, F., *Z. physiol. Chem.*, **138**, 216 (1924).
148. Willstätter, R., et Waldschmidt-Leitz, E., *Z. physiol. Chem.*, **134**, 161 (1924).
149. Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E., et Memmen, F., *Z. physiol. Chem.*, **125**, 93 (1923).

SYNTHESIS OF DISACCHARIDES WITH BACTERIAL ENZYMES

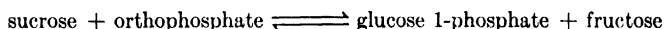
By W. Z. HASSID and M. DOUDOROFF,
Berkeley, California

CONTENTS

I. Introduction.....	123
II. Preparation of the Enzymic Extract from <i>Pseudomonas saccharophila</i>	124
III. Synthesis of Sucrose through Mechanism of Phosphorolysis.....	126
IV. Specificity of Sucrose Phosphorylase.....	129
V. Structure of Synthetic Disaccharides.....	131
A. Synthetic Sucrose.....	131
B. α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranoside.....	132
C. α -D-Glucopyranosyl- β -D-xyloketofuranoside.....	134
D. D-Glucosyl-L-araboketoside.....	135
E. 3-[α -D-Glucopyranosyl]-L-arabinopyranose.....	136
VI. Formation of Sucrose and Other Disaccharides through Exchange of Glycosidic Linkages.....	138
VII. Relation of Sucrose Phosphorylase to Polysaccharide Synthesizing Enzymes.....	140
References.....	142

I. Introduction

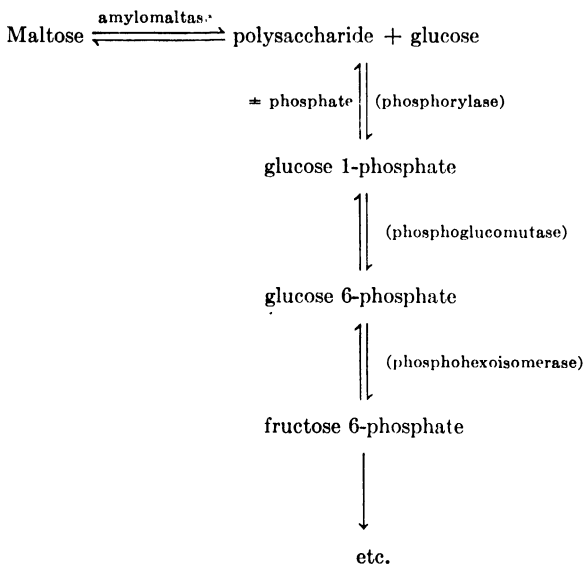
It has been demonstrated within the last several years that some species of bacteria possess an enzyme which catalyzes the phosphorolytic decomposition of the disaccharide, sucrose, with the production of glucose 1-phosphate and fructose. The reaction is reversible and may be written as follows:



This enzyme has been named "sucrose phosphorylase." It occurs in *Leuconostoc mesenteroides* (31), *Pseudomonas saccharophila* (6), and *Pseudomonas putrefaciens* (13). The glucose 1-phosphate produced in the reaction can enter the well-known glycolytic series of reactions, as shown by the presence of the enzymes, phosphoglucomutase and phosphohexoisomerase, in *P. putrefaciens* (13). These enzymes are responsible for the successive transformation of glucose 1-phosphate to glucose 6-phosphate and fructose 6-phosphate. Although a phos-

phorylase catalyzing the synthesis of polysaccharide from glucose 1-phosphate has not been demonstrated in *P. putrefaciens*, it is possible that the reserve carbohydrate may be synthesized directly from glucose 1-phosphate produced in these organisms.

An analogous mechanism for the utilization of maltose by *Escherichia coli* involves the participation of the enzymes, amyломaltase, phosphoglucomutase, and phosphohexoisomerase (12,41). The amyломaltase transforms maltose directly to polysaccharide and glucose, the polysaccharide being further metabolized through the usual glycolytic pathway as follows:



Both sucrose phosphorylase and amyломaltase are enzymes that catalyze an exchange of glycoside linkages. This type of reaction appears to be fairly widespread in nature and may be involved in the synthesis of various disaccharides and polysaccharides (26).

II. Preparation of the Enzymic Extract from *Pseudomonas saccharophila*

Sucrose phosphorylase is an "adaptive enzyme," formed only if *P. saccharophila* is cultured with sucrose or raffinose as substrate. The enzyme is not formed when glucose, fructose, xylose, maltose, or

trehalose is used as a carbon source. The production of phosphorylase can be attributed to the fact that sucrose is formed as an intermediate product of raffinose metabolism. In this process the raffinose appears to be hydrolyzed to sucrose and galactose by melibiase (7).

When sucrose or raffinose is oxidized by intact cells of *P. saccharophila*, glucose 1-phosphate accumulates within the cells, indicating that sucrose phosphorylase is involved in the metabolism of these carbohydrates (7). Glucose 1-phosphate cannot be detected in the bacteria during the oxidation of glucose, trehalose, and melibiose.

Sucrose phosphorylase preparations can be readily obtained by growing *P. saccharophila* in a mineral medium with sucrose as the sole source of carbon, drying of the cells *in vacuo* over P_2O_5 and suspending the material in phosphate or bicarbonate buffer at pH 6.6-7.0 (5).

The extracts contain, in addition to sucrose phosphorylase, other enzymes, especially invertase and phosphatase. Since the presence of these enzymes interferes with the study of the properties and action of sucrose phosphorylase, it is necessary to remove the invertase and phosphatase. This can be accomplished by separation of the extract from the insoluble debris by centrifugation, followed by precipitation of the enzyme from the extract with ammonium sulfate. The following method has been used for active sucrose phosphorylase preparations which were practically devoid of interfering enzymes.

Cultures of *P. saccharophila* Doudoroff (4) are grown in a liquid medium containing $M/30$ $KH_2PO_4 \cdot Na_2HPO_4$ (Sørensen phosphate buffer at pH 6.64), 0.1% NH_4Cl , 0.05% $MgSO_4$, 0.005% $FeCl_3$, 0.001% $CaCl_2$, and 0.3% sucrose at 29°C., with constant agitation to provide ample aeration. Under such conditions almost 50% of the carbon content of sucrose is converted into cell material, the remainder being oxidized to carbon dioxide. Traces of reducing sugar appear in the medium, as well as occasionally small amounts of pyruvic acid, which disappears in the later stages of development. The cells are harvested by centrifugation, washed twice with distilled water, and dried at room temperature *in vacuo* over P_2O_5 .

The dry cells are extracted twice with $M/30$ Sørensen phosphate buffer at pH 6.64. For each extraction, the cells are well dispersed in about 10 ml. of buffer per gram of bacteria either by grinding in a mortar or by agitation in a Waring Blender, and centrifuged out after 20 minutes at room temperature. The combined supernatants are then treated with ammonium sulfate at 0.8 saturation and kept at +5° for several hours. The precipitate is collected by centrifugation, resuspended in the original volume of buffer, and treated for 1 hour at 5° with 0.3 saturated ammonium sulfate. The precipitate is discarded, and the supernatant is brought up to 0.63 saturation of ammonium sulfate and stored at 5° for three days or longer. During storage the interfering enzymes are inactivated while the precipitate retains most of the phosphorylase activity. Enzyme solutions can be prepared by suspending the precipitate in phosphate, citrate, or bicarbonate-carbonate buffers at pH 6.4-7.0. If the preparations are not clear, the fractionation with ammonium sulfate can be repeated and the material that

is insoluble in buffer can be removed by centrifugation. If the presence of phosphate is not desired in the final preparation, the enzyme can be reprecipitated several times from $M/30$ citrate adjusted to pH 6.64. Enzyme preparations can be dialyzed against tap water with little loss of activity but are inactivated by dialysis against distilled water.

III. Synthesis of Sucrose through Mechanism of Phosphorolysis

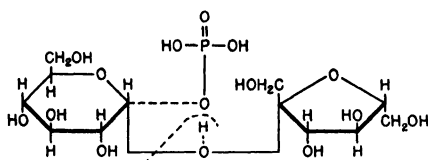
The nature of the mechanism of sucrose formation has been of special interest and the object of intensive investigation. The enzyme invertase or β -fructosidase which hydrolyzes sucrose to glucose and fructose is widely distributed in plants. This enzyme was considered for a long time as having the double role of a hydrolytic and synthetic enzyme (34a,42), and the formation of sucrose was assumed to occur as a result of reversed inversion. However, attempts to demonstrate synthesis of sucrose by invertase were not successful (36). Since it is known that the equilibrium lies far in the direction of hydrolysis, and inasmuch as reversal of the reaction to a detectable extent has not been achieved, it does not seem possible that invertase participates in sucrose synthesis in the plant (8).

The fact that leaves of sucrose-producing plants such as beets and peas were found to contain considerable amounts of hexose phosphates suggested that sugar phosphates might be involved in the mechanism of sucrose formation and that phosphorylation is an essential step in this process (2,19,35). Furthermore, it was shown that iodacetate which is known to inhibit phosphorylation, also inhibits sucrose synthesis in plants (34), indicating that this process is essential for sucrose synthesis. That the synthesis of sucrose can actually take place through the mediation of a phosphorolytic mechanism has been shown by the work of Doudoroff, Kaplan, and Hassid (6) with the enzyme from *Pseudomonas saccharophila*. It was found that dried cells of this microorganism contain an enzyme which catalyzes the breakdown of sucrose in the presence of inorganic phosphate with the formation of D -glucose 1-phosphate (Cori ester) and D -fructose. It was also demonstrated that this reaction is reversible, that is, the same sucrose phosphorylase will catalyze the synthesis of sucrose from glucose 1-phosphate and fructose.

The dried bacteria also contain the hydrolytic enzyme, invertase, which competes with the sucrose phosphorylase for sucrose. However, most of the invertase can be eliminated from the bacterial preparations

by treatment with ammonium sulfate. Using a partially purified sucrose phosphorylase preparation and a mixture of glucose 1-phosphate and fructose, Hassid, Doudoroff, and Barker (20) succeeded in crystallizing a nonreducing disaccharide which is identical with natural sucrose.

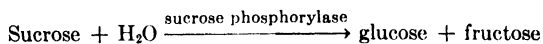
Similar to the process of phosphorolysis of glycogen and starch (16, 3), the formation of glucose 1-phosphate and fructose from sucrose and inorganic phosphate may be considered to occur as the result of phosphorolytic cleavage of glucose from the sucrose molecule, the sucrose being disrupted without water entering into the reaction. The reverse reaction, the formation of sucrose from glucose 1-phosphate and fructose, takes place as the result of "dephosphorolytic" condensation of the two monosaccharides. The reversible phosphorolysis of sucrose can be represented as shown in Scheme I.



SCHEME I
PHOSPHOROLYSIS OF SUCROSE

In the presence of the sucrose phosphorylase from *Pseudomonas saccharophila*, glucose 1-phosphate and fructose enter into an equilibrium with sucrose and inorganic phosphate, the glucose 1-phosphate and the inorganic phosphate entering as divalent ions.

It has been demonstrated that the addition of inorganic arsenate to sucrose phosphorylase will catalyze the hydrolytic decomposition of sucrose (9) according to the reaction:

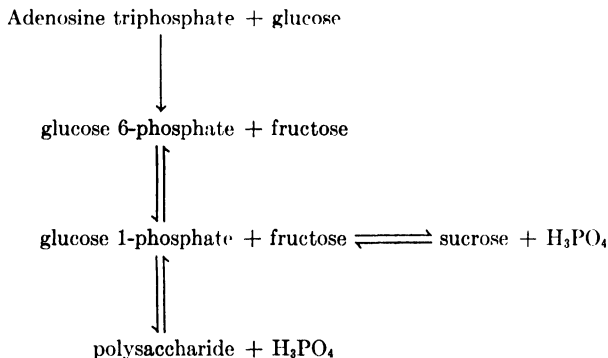


Similarly, arsenate in the presence of sucrose phosphorylase will decompose glucose 1-phosphate to glucose and inorganic phosphate.

As with starch phosphorylase from potato (33), apparently an unstable intermediate, glucose 1-arsenate, is formed which does not accumulate but is decomposed to glucose and inorganic arsenate. The system, enzyme + arsenate, becomes a catalyst which behaves both as an invertase and as a phosphatase.

As in the formation of glycogen and starch, the energy needed for the formation of the glycosidic bond in sucrose may be derived from utilization of the energy-rich phosphate bonds of compounds such as adenosine triphosphate. The glycosidic bond energy is approximately equal to the difference between free and ester-bound phosphate, being approximately 3000 cal. (37,32,40). From calculation of the equilibrium constant of the phosphorolytic reaction, the sucrose bond appears to be on a higher energy level than the ordinary glycosidic or phosphate ester bonds.

It is tempting to speculate that the formation of sucrose in higher plants occurs through a mechanism similar to that for the formation of starch. The energy for this synthesis would be derived from energy-rich compounds in accordance with the following scheme:



There is no evidence, however, that synthesis of sucrose in higher plants takes place through an identical mechanism with that of sucrose formation by the bacterial sucrose phosphorylase (8). At equilibrium, the catalyzed reaction favors the breakdown rather than the synthesis of sucrose. The equilibrium constant of the reaction, expressed as

$$K = \frac{(\text{sucrose})(\text{phosphate})}{(\text{fructose})(\text{glucose 1-phosphate})}$$

is approximately 0.05 at pH 6.6 and 30°, and increases slightly at lower pH values. Yet, many higher plants produce very high concentrations of the disaccharide in the virtual absence of the phosphorolytic products. It is clear if the equilibrium reactions postulated in the above scheme were involved, sucrose would occur only as a minor product.

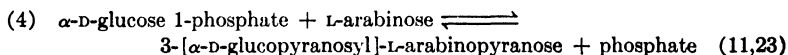
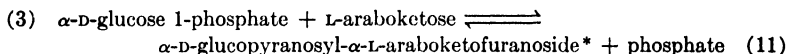
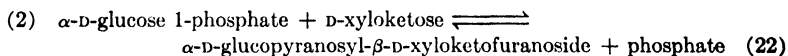
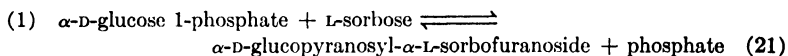
However, biochemical studies on various plants support the view that the synthesis of sucrose may involve a reaction in which phosphate esters of glucose, fructose, or both hexoses may serve as substrates.

It is known that in the absence of photosynthesis aerobic metabolism is necessary for the formation of sucrose by higher plants (18,38). Aerobic oxidations may provide the energy for the phosphorylation of the substrates involved in the synthesis of sucrose.

IV. Specificity of Sucrose Phosphorylase

Sucrose phosphorylase of *Pseudomonas saccharophila* is specific with regard to the glucose portion of its substrates. The enzyme is incapable of combining either α -D-galactose 1-phosphate, α -D-mannose 1-phosphate, α -D-xylose 1-phosphate, or α -L-glucose 1-phosphate (39,43) with fructose or decomposing raffinose (melibiose 1-fructoside).^{1,2} A slight reaction has been observed between α -maltose 1-phosphate and fructose, but the nature of the reaction has not been elucidated.

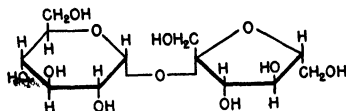
On the other hand, the enzyme is far less specific with regard to substituents for the second sucrose component, D-fructose. The sucrose phosphorylase can catalyze the synthesis and decomposition of several nonreducing disaccharides (sucrose analogs) and of one reducing disaccharide of an entirely different configuration. These disaccharides have been synthesized by allowing sucrose phosphorylase to act on mixtures of glucose 1-phosphate with various sugars. The following reactions have been demonstrated to occur:



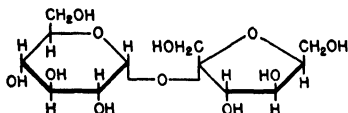
It appears, therefore, that the same enzyme can catalyze at least two diverse reactions: one involving the carbonyl group on the second carbon atom of a ketose and another involving the secondary alcohol group of the third carbon atom of an aldose.

* The linkage pertaining to the L-araboketoside part of this disaccharide was incorrectly designated in the original publication (Ref. 11) as the β -type.

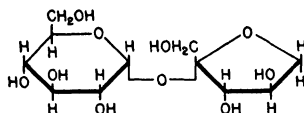
The first three of the synthetic disaccharides are nonreducing, easily hydrolyzable with acid, and are structurally related to sucrose. Formulas III, IV, and V show the close similarity in structures of these disaccharides and sucrose (see II). It is noteworthy that in all of these disaccharides, the ketose portion exists in the furanose form (five-membered ring). The fourth disaccharide (see VI), however,



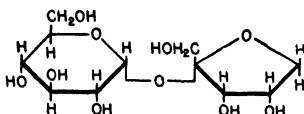
(II) Sucrose (α -D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranoside)



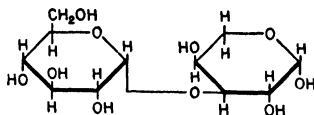
(III) α -D-glucopyranosyl- α -L-sorbofuranoside



(IV) α -D-glucopyranosyl- β -D-xyloketofuranoside



(V) α -D-glucopyranosyl- α -L-araboketofuranoside



(VI) 3-[α -D-glucopyranosyl]-L-arabinopyranose

has very different properties and a strikingly different structure than any of the others. It is reducing and is difficultly hydrolyzable with acid; it possesses a 1,3-linkage in which the glucose residue is bound to an alcoholic carbon rather than to a carbonyl carbon as in sucrose. This striking difference between the nonreducing disaccharides and the reducing disaccharide synthesized with preparations of sucrose phosphorylase led at first to the suspicion that a different phosphorylase might be involved in the reaction with L-arabinose. However, from the consideration of the results of a number of experiments (11), this possibility appears to be extremely remote. There is good reason to believe that the same enzyme is involved in both reactions.

The relative rates of the enzymic synthesis of sucrose and α -D-glucosyl-L-arabinose were found to be constant during purification, fractional precipitation, and partial heat inactivation of the enzyme. Furthermore, the enzyme responsible for the utilization of L-arabinose was produced by the bacteria in response to the presence of sucrose, but not of other sugars, including L-arabinose, in the medium. Finally, L-arabinose was shown to compete with fructose for the enzyme, since its addition was found to decrease the total rate of glucose 1-phosphate utilization when fructose was present in high concentration. On the other hand, at low concentrations of D-fructose, which normally do not saturate the enzyme, the addition of L-arabinose was found to increase the total rate of decomposition of glucose 1-phosphate.

A number of other carbohydrates were tested as possible substrates for disaccharide formation by means of sucrose phosphorylase in the presence of glucose 1-phosphate. The following sugars showed little or no reaction with this ester: dihydroxyacetone, erythrose, D-xylose, D-lyxose, D-arabinose, L-xyloketose, D-araboketose, L-fucose, L-rhamnose, D-glucose, D-mannose, D-galactose, L-fructose, D-tagatose, D-mannoheptulose, D-fructose 6-phosphate, D-fructose diphosphate, and turanose.

V. Structure of Synthetic Disaccharides

A. SYNTHETIC SUCROSE

Synthesis of sucrose can be readily achieved from a mixture of glucose 1-phosphate and fructose by means of an enzymic extract from *P. saccharophila*. The reaction is carried out at pH 6.8 and 37° in the presence of barium acetate. The inorganic phosphate and the excess esterified phosphate are removed from the mixture by alcohol precipitation; the unreacted fructose is fermented out with *Torula monosa*. The solution containing the sucrose is further purified by passing it through ion exchange columns and crystallized by concentration of the solution to a sirup and addition of absolute alcohol.

The synthetic sucrose (20) possesses properties identical with those of natural sucrose. Its empirical formula obtained by elementary analysis is $C_{12}H_{22}O_{11}$. It does not reduce Fehling solution, but after acid or enzymic hydrolysis the phenylosazone obtained from the inversion mixture is D-glucosazone; the hydrolyzate also gives a positive Seliwanoff reaction. The reducing value after hydrolysis and the yield of D-glucose and D-fructose are theoretical for invert sugar. The

specific rotation $[\alpha]_D +66.5^\circ$ is changed after inversion to -20° . The synthetic product and natural sucrose give an identical x-ray diffraction pattern and the synthetic sucrose is hydrolyzed with acid at the same rate as the natural sugar. An octaacetate derivative prepared from the synthetic sugar has a specific rotation $[\alpha]_D +60^\circ$ in chloroform and a melting point of $69-70^\circ$. These constants agree with those of natural sucrose

Owing to the successful *in vitro* synthesis of sucrose further knowledge has been gained regarding the chemical constitution of this carbohydrate. The type of glycosidic linkages which combine glucose and fructose in the sucrose molecule has hitherto not been known with certainty. Although the work of Purves and Hudson (44) and others (1) indicated that the structure of sucrose is α -D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranoside, the question as to whether the α - or β -form of either hexose was involved in joining the monosaccharide units to form the disaccharide had not been settled conclusively. By showing that the enzymically produced sucrose is identical with the naturally occurring compound and that it is synthesized through "dephosphorylytic" condensation of the α -form of glucose 1-phosphate and fructose, the α -configuration of glucose in the sucrose molecule has been confirmed. This conclusion is adduced from the fact that when polysaccharide is formed through the action of animal or plant phosphorylase from α -glucose 1-phosphate, as a result of exchange of the α -linked phosphoric acid for a glycosidic linkage with another monosaccharide, the α -type of linkage is not altered.

The enzymic synthesis of sucrose also explains the formation of the furanose form of fructose in the sucrose molecule. The fact that sucrose is directly formed from D-glucose 1-phosphate and D-fructose supports the evidence of Isbell and Pigman (29) and Gottschalk (15) that the latter monosaccharide occurs in solution in an equilibrium mixture of furanose and pyranose forms. This makes it unnecessary to postulate a special mechanism of stabilization of a five-membered ring before the formation of compound sugars containing the D-fructose molecule (19).

B. α -D-GLUCOPYRANOSYL- α -L-SORBOFURANOSIDE

The nonreducing D-glucosyl-L-sorbose, like synthetic sucrose, was synthesized through the action of the *P. saccharophila* enzyme from α -D-glucose 1-phosphate and L-sorbose (21). Elementary analysis of this disaccharide showed that its empirical formula is $C_{12}H_{22}O_{11}$. It has a sweet taste, gives a positive Seliwanoff reaction, appears to be only very slightly affected by invertase, but it is easily

hydrolyzed with acid. The reducing value obtained after acid hydrolysis corresponds to a disaccharide consisting of D-glucose and L-sorbose. After fermenting out the glucose from the hydrolyzate, a pure L-sorbose phenylosazone could be prepared. The melting point of the sugar is 178–180°. The specific rotation is $[\alpha]_D +33^\circ$. Hydrolysis with acid changes the rotation to $+7.5^\circ$. This value agrees with the expected rotation for an equimolar mixture of D-glucose and L-sorbose. The rate of acid hydrolysis is approximately twice that of sucrose. The acetylated disaccharide, an octaacetate, has a rotation in chloroform of $[\alpha]_D +38^\circ$.

Since the glucosyl-sorbose is nonreducing, the glucose and sorbose are obviously linked through the carbonyl groups. Evidence that the L-sorbose exists in the disaccharide as sorbofuranose was obtained by oxidizing the compound with sodium periodate (30). In a disaccharide consisting of glycopyranose and sorbofuranose glycosidically united through positions 1 of the aldose and 2 of the ketose, the glucose residue would possess three adjacent free hydroxyls, on its carbon atoms 2, 3, and 4, and the sorbose residue would possess two free hydroxyls, on its carbon atoms 3 and 4. On oxidation of such a disaccharide with periodate, the glucose residue should consume two moles of periodate and form one mole of formic acid, while the sorbose residue should consume one mole of periodate. A total of three moles of periodate would thus be consumed and one mole of formic acid would be formed per mole of disaccharide. If the sorbose residue were to exist in the disaccharide in the pyranose form, it would also contain three hydroxyl groups on carbon atoms 3, 4, and 5, and, as in the case of the glucose, it should consume two moles of periodate and give rise to one mole of formic acid. In this case a total of four moles of periodate would be consumed and two moles of formic acid formed per mole of disaccharide. Actually, on oxidation of the carbohydrate with sodium periodate, three moles of periodate are consumed and one mole of formic acid is formed. These data agree with the assumption that the disaccharide contains a pyranose and a furanose ring. The possibility that the disaccharide is made up of glucofuranose and sorbopyranose can also be eliminated on the basis of the periodate oxidation data. Glucofuranose would contain two pairs of adjacent hydroxyls, on carbon atoms 2 and 3 and 5 and 6, and the sorbopyranose would have three adjacent hydroxyls, on carbon atoms 3, 4, and 5. In oxidizing such a disaccharide, a total of four moles of periodate would thus be used, giving rise to one mole of formic acid. This is inconsistent with the experimental data.

The fact that this disaccharide, like sucrose, is formed as a result

of "dephosphorolytic" condensation involving α -D-glucose 1-phosphate supports the view that D-glucose also exists in the D-glucosyl-L-sorbose as the α -form.

This nonreducing disaccharide gives a blue-green color with diazouracil, a reaction shown by Raybin (45) to be specific for sucrose and other compounds containing the same type of glycosidic glucose-fructose linkage, such as raffinose, gentianose, and stachyose. The analogy of the synthetic nonreducing glucosyl-sorbose to sucrose in its reaction with diazouracil and with the bacterial sucrose phosphorylase indicates that the local structure about the glycosidic linkage is the same as that of sucrose.

The striking similarity between sucrose and the D-glucosyl-L-sorbose formula III is evident when the structural formula of the latter is compared with that of sucrose (formula II). The sorbose component of this disaccharide is an L-sugar in contrast to the D-fructose unit existing in sucrose. Since β -D-fructose and α -L-sorbose have the same configuration for their second carbon atoms (28), it is necessary to designate the ketose portion of the disaccharide as α -L-sorbose.

It is interesting to note that D-fructose, which has a pyranose structure in the free state, assumes a furanose configuration whenever it combines with another sugar to form an oligosaccharide or polysaccharide. Apparently the ketohexose, L-sorbose, shows the same behavior.

C. α -D-GLUCOPYRANOSYL- β -D-XYLOKETOFURANOSIDE

The disaccharide synthesized from D-glucose 1-phosphate and D-xyloketose by the same enzyme (22) has an empirical formula of $C_{11}H_{20}O_{10}$. The compound does not reduce Fehling solution or alkaline ferricyanide. It is practically unaffected by invertase, but is easily hydrolyzed with acid. When the disaccharide is hydrolyzed and the D-glucose fermented out, a phenylosazone is obtained which is identical with that of D-xylose. The specific rotation of the disaccharide is $[\alpha]_D +43^\circ$, and its melting point is $156-157^\circ$. Its rate of hydrolysis with acid is approximately 30% greater than that of sucrose. The acetylated derivative has a specific rotation $[\alpha]_D$ in chloroform of $+22^\circ$ and a melting point of $180-181^\circ$.

The fact that the disaccharide is nonreducing shows that the glucose and D-xyloketose are linked through the carbonyl groups. Inasmuch as the carbonyl group in xyloketose occurs on the second carbon atom, the largest possible semiacetal ring for the ketose component is the 2,5-furanose ring and the possibility of a pyranose ring is defi-

nately excluded. The furanose structure of the xyloketose was confirmed experimentally by oxidation of the disaccharide with sodium periodate. A disaccharide consisting of glucopyranose and xyloketofuranose glycosidically united through positions 1 and 2 of the aldose and ketose monosaccharides, respectively, would possess three adjacent free hydroxyls on carbon atoms 2, 3, and 4 in the glucose residue and two free hydroxyls on carbon atoms 3 and 4 in the xyloketose residue. When subjected to oxidation, a disaccharide of this structure should consume two moles of periodate and form one mole of formic acid due to the glucose residue, and consume one mole of periodate due to the xyloketose residue. A total of three moles of periodate would thus be consumed and one mole of formic acid should be formed per mole of disaccharide. The actual experimental results for this disaccharide agreed with this expectation. Any other ring structure for either the glucose or the ketose component would have given different results.

That the glucose exists in the glucosyl-xyloketoside as the α -form is deduced from the fact that the disaccharide is formed as a result of "dephosphorolytic" condensation involving α -D-glucose 1-phosphate. Like the other synthetic disaccharides, it gives the Raybin reaction (45), which indicates that the local structure about the glycosidic linkage in the glucosylxyloketoside is the same as that of sucrose. This evidence makes it possible to postulate the structural formula for the disaccharide as shown in formula (IV), and to name it systematically α -D-glucopyranosyl- β -D-xyloketofuranoside. This compound and sucrose are structurally identical, except that sucrose has an additional $-\text{CH}_2\text{OH}$ group attached to carbon atom 5 of the ring of the ketose moiety.

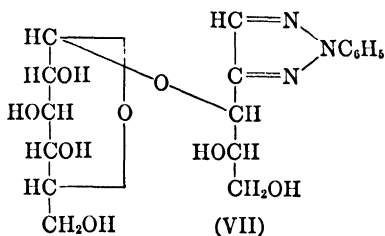
D. D-GLUCOSYL-L-ARABOKETOSIDE

Using the same enzyme preparation from *P. saccharophila* another nonreducing disaccharide consisting of D-glucose and L-araboketose has been synthesized from α -D-glucose 1-phosphate and L-araboketose (11). Like the synthetic sucrose and the other two disaccharides, it does not reduce Fehling solution or alkaline ferricyanide solution and it is not affected by invertase. It is easily hydrolyzed with dilute acid to D-glucose and a pentose sugar. When the glucose is fermented out, a phenylosazone is obtained which is identical with that of L-arabinose. The disaccharide gives Raybin's diazouracil reaction, indicating that it contains the same type of linkages as sucrose. While the structure of this disaccharide has not been definitely determined, there is good reason to believe that it is α -D-glucopyranosyl- α -L-araboketofuranoside (formula V).

E. 3-[α -D-GLUCOPYRANOSYL]-L-ARABINOPYRANOSE

Similar to the previously described nonreducing disaccharides, this reducing disaccharide (23) is formed from α -D-glucose 1-phosphate and L-arabinose by means of the *P. saccharophila* enzyme. It contains two molecules of water of crystallization, having an empirical formula of $C_{11}H_{20}O_{10} \cdot 2H_2O$, and has a specific rotation $[\alpha]_D$ in water of $+156^\circ$. It reduces Fehling and alkaline ferricyanide solutions and, unlike sucrose and its analogs, it is difficultly hydrolyzable with acid. Upon hydrolysis the disaccharide yields one mole of D-glucose and one mole of L-arabinose. The phenylosotriazole derivative of the disaccharide prepared according to Hudson *et al.* (17) is readily hydrolyzed with acid to D-glucose and L-arabinose phenylosotriazole, showing that the L-arabinose constitutes the free reducing unit in the disaccharide. Since α -D-glucose 1-phosphate is involved in the enzymic synthesis of the disaccharide it may be assumed that the glucose component exists in the α -form.

On oxidation of the phenylosotriazole derivative of the disaccharide with sodium periodate, three moles of periodate are consumed with the formation of one mole each of formic acid and formaldehyde per mole of phenylosotriazole derivative. The structure of this compound is, therefore, 3-[α -D-glucopyranosyl]-L-arabinose phenylosotriazole in which D-glucose is attached through carbon atom 1 to carbon atom 3 of L-arabinose as shown by formula (VII).

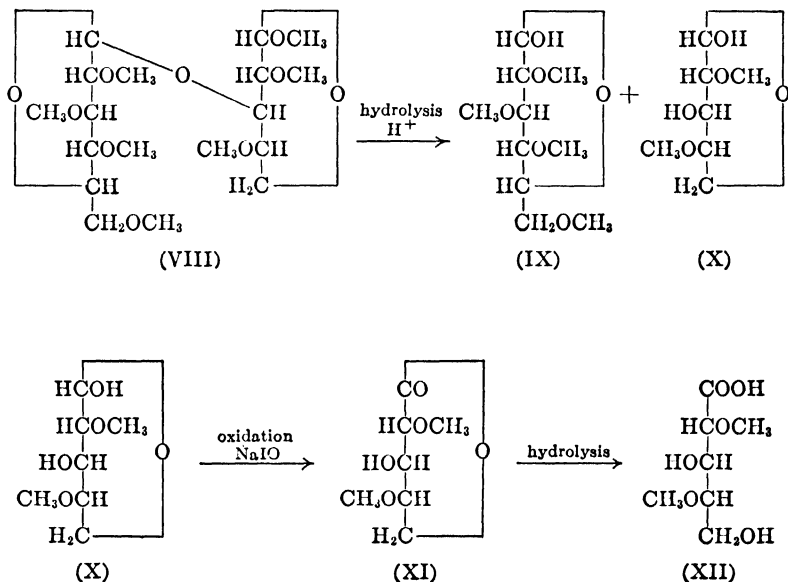


If the D-glucose in the D-glucopyranosyl-L-arabinose phenylosotriazole were attached to carbon atom 4 of the L-arabinose derivative, oxidation of this compound with sodium periodate would require two moles of periodate and would liberate one mole of formic acid without formaldehyde production. Junction of D-glucose to carbon atom 5 of the L-arabinose phenylosotriazole would require three moles of periodate whereby one mole of formic acid would be produced, and no formaldehyde formed.

On methylation of the disaccharide with dimethyl sulfate and sodium hydroxide a hexamethylmethyl derivative of the carbohydrate

was obtained. When this fully methylated derivative (VIII) was hydrolyzed with acid, 2,3,4,6-tetramethyl-D-glucose (IX) and dimethyl-L-arabinose (X) were produced. Since position 3 in the L-arabinose component (VII) was shown to be occupied in glycosidic linkage with D-glucose, the dimethyl-L-arabinose could be either the 2,5- or 2,4-dimethyl derivative (X), depending on whether the L-arabinose unit originally exists in the disaccharide in the furanose or pyranose form. The ring type of the L-arabinose was ascertained by subjecting the dimethyl-L-arabinose to oxidation with sodium periodate, after it had been oxidized with hypiodite to the corresponding lactone (XI) and subsequently hydrolyzed to the straight chain, dimethyl-L-arabonic acid (XII).

On treatment of the dimethyl derivative with sodium periodate, no periodate was consumed, showing that the compound did not possess a pair of adjacent hydroxyls in its molecule. On the basis of this observation the 2,5-dimethyl-L-arabonic acid can be eliminated. It therefore must be concluded that the dimethyl derivative is 2,4-dimethyl-L-arabonic acid (XII). The free hydroxyl in position 3 is obviously restored in the dimethyl-L-arabinose when the methylated



disaccharide is hydrolyzed. The hydroxyl in position 5 is formed when its internal ring is broken in the process of hydrolysis of the lactone forming dimethyl-L-arabonic acid, which is, as mentioned, a straight chain compound.

The pyranose configuration in the dimethyl-L-arabinose was confirmed by the results obtained from the study of the rate with which its lactone derivative is hydrolyzed to the open chain acid (24).

When the dimethyl-L-arabono lactone was dissolved in water, it was found to be almost completely hydrolyzed within four hours. This was indicated by a change of its rotation from $[\alpha]_D +60^\circ$ to $+24^\circ$. A constant value of $[\alpha]_D +17^\circ$ was reached within less than twenty-four hours. Since the rate of change in rotation of this methylated lactone due to hydrolysis is high, it strongly indicates that the lactone possesses a pyranose configuration. This observation confirms the periodate oxidation data, showing that the dimethyl derivative is 2,4-dimethyl-L-arabonic acid.

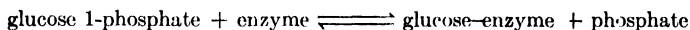
On the basis of these results this reducing disaccharide may be designated as 3- $[\alpha$ -D-glycopyranosyl]-L-arabinopyranose and its structural formula written as in formula (VI).

VI. Formation of Sucrose and Other Disaccharides through Exchange of Glycosidic Linkages

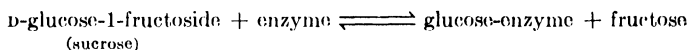
In the early experiments (6,20-22) the formation and breakdown of the synthetic disaccharides with the aid of sucrose phosphorylase was thought to be a reaction in which glucose 1-phosphate appeared to be an essential product or substrate of the enzyme activity. However, further studies revealed that the glucose 1-phosphate could be considered merely as one of a number of "glucose donors" for the enzyme. The enzyme itself was shown to be not only a "phosphorylase" but also a "transglucosidase," capable of mediating the transfer of the glucose of the substrates to a variety of "acceptors." Disaccharides could thus be synthesized and broken down through the exchange of one glycosidic linkage for another.

The information concerning this mechanism was first obtained through the use of radioactive phosphate (10). It was observed that when inactive glucose 1-phosphate and inorganic phosphate labeled with P^{32} were added to sucrose phosphorylase preparations in the absence of ketose sugars, a rapid redistribution of the isotope occurred between the organic and inorganic fractions. Glucose, which is known

to inhibit sucrose phosphorylase, was also found to inhibit the exchange reaction. Similarly, the presence of fructose was found to decrease the rate of exchange. Such a decrease in rate would be expected if fructose competes with phosphate for the glucose residue of glucose 1-phosphate. These observations led to the assumption that the enzyme combines reversibly with the glucose portion of glucose 1-phosphate, releasing inorganic phosphate, in accordance with the equation:

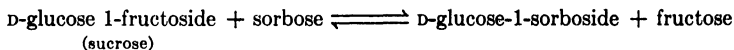


The equilibrium reaction would require that the energy of the glucose-phosphate linkage be preserved in the glucose-enzyme bond. The glucose-enzyme complex should then be capable of donating glucose to suitable acceptors. Indeed, it was later shown (46) that in a phosphate-free medium, sucrose phosphorylase brings about the exchange of added free fructose labeled with C¹⁴ with the fructose portion of sucrose. Sucrose having half of the molecule (fructose) labeled with C¹⁴ has thus been synthesized. This reaction may be written as follows:

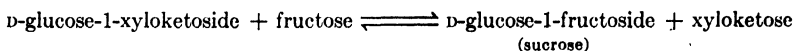


It will be observed that in both reactions, the enzyme acts as glucose donor and acceptor to its substrates, and can thus catalyze the exchange of an ester bond for a glycosidic linkage. The role of sucrose phosphorylase in the reversible phosphorolysis of sucrose can thus be interpreted as a summation of the two above reactions.

The function of sucrose phosphorylase as a "glucose transferring agent" was further indicated by the fact that the enzyme catalyzes an exchange of glycosidic bonds between two different disaccharides in the absence of organic and inorganic phosphate. Thus the D-glycosyl-L-sorbose, which was originally synthesized from glucose 1-phosphate and L-sorbose, can also be prepared by a reaction between sucrose and L-sorbose (10):

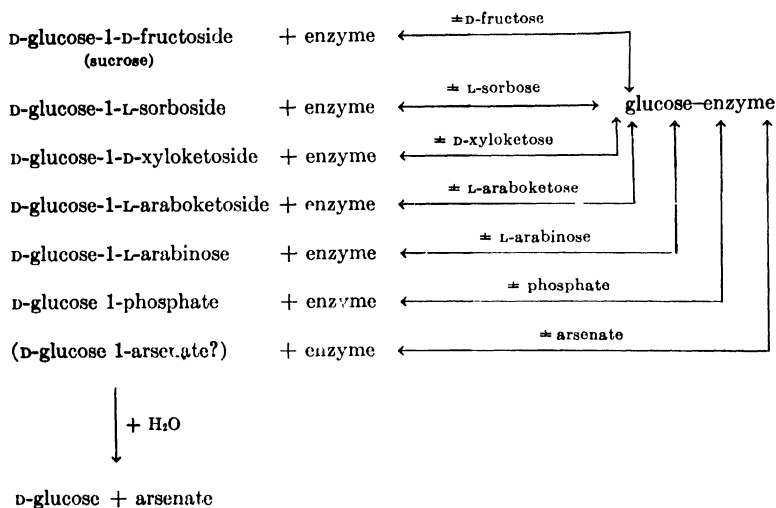


Similarly, sucrose was prepared by a reaction between the synthetic disaccharide, D-glucosyl-xyloketoside, and fructose (10):



The enzymic behavior of sucrose phosphorylase explains the observed role of arsenate in causing a hydrolytic decomposition of both sucrose and glucose 1-phosphate in the presence of the enzyme (9). Arsenate presumably acts as a glucose acceptor with the enzyme, to form an unstable glucose arsenate, which hydrolyzes spontaneously to glucose and arsenate. Thus, any substance capable of acting as a glucose donor to the enzyme, is eventually decomposed to its products of hydrolysis.

The observed reaction of sucrose phosphorylase can be represented diagrammatically by the following scheme:



VII. Relation of Sucrose Phosphorylase to Polysaccharide Synthesizing Enzymes

It is of interest to note that while sucrose phosphorylase of *Pseudomonas saccharophila*, like the animal and plant phosphorylases, acts as a phosphorylolytic enzyme, it is also related in its action to a group of bacterial enzymes known to catalyze polysaccharide syntheses which do not involve D-glucose 1-phosphate (26). These enzymes are capable of exchanging glycosidic linkages of disaccharides for those of polysaccharides, and can, therefore, be designated, along with sucrose phosphorylase, as "transglycosidases." Thus, sucrose phos-

References

1. Armstrong, E. F., and Armstrong, K. F., *The Carbohydrates*. Longmans, Green, London, 1934, pp. 181-182.
2. Burkard, J., and Neuberg, C., *Biochem. Z.*, **270**, 229 (1939).
3. Cori, C. F., *Endocrinology*, **26**, 285 (1940).
4. Doudoroff, M., *Enzymologia*, **9**, 59 (1940).
5. Doudoroff, M., *J. Biol. Chem.*, **151**, 351 (1943).
6. Doudoroff, M., Kaplan, N., and Hassid, W. Z., *J. Biol. Chem.*, **148**, 67 (1943).
7. Doudoroff, M., *J. Biol. Chem.*, **157**, 699 (1945).
8. Doudoroff, M., *Federation Proc.*, **4**, 241 (1945).
9. Doudoroff, M., Barker, H. A., and Hassid, W. Z., *J. Biol. Chem.*, **170**, 147 (1947).
10. Doudoroff, M., Barker, H. A., and Hassid, W. Z., *J. Biol. Chem.*, **168**, 725 (1947).
11. Doudoroff, M., Hassid, W. Z., and Barker, H. A., *J. Biol. Chem.*, **168**, 733 (1947).
12. Doudoroff, M., Hassid, W. Z., Putman, E. W., Potter, A. L., and Lederberg, J., *J. Biol. Chem.*, **179**, 921 (1949).
13. Doudoroff, M., Wiame, J., and Wolochow, H., *J. Bact.*, **57**, 423 (1949).
14. Fowler, F. L., Buckland, I. K., Brauns, F., and Hibbert, H., *Can. J. Research*, **B15**, 486 (1937).
15. Gottschalk, A., *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, **20**, 139 (1943).
16. Hanes, C. S., *Proc. Roy. Soc. London*, **B129**, 174 (1940).
17. Hann, R. M., and Hudson, C. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 735 (1944). Haskins, W. T., Hann, R. M., and Hudson, C. S., *ibid.*, **67**, 939 (1945).
18. Hartt, C. E., *Hawaiian Planters' Record*, **47**, 113 (1943).
19. Hassid, W. Z., *Plant Physiol.*, **13**, 641 (1938).
20. Hassid, W. Z., Doudoroff, M., and Barker, H. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 1416 (1944).
21. Hassid, W. Z., Doudoroff, M., Barker, H. A., and Dore, W. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 1394 (1945).
22. Hassid, W. Z., Doudoroff, M., Barker, H. A., and Dore, W. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 1465 (1946).
23. Hassid, W. Z., Doudoroff, M., Potter, A. L., and Barker, H. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 306 (1948).
24. Haworth, W. N., *The Constitution of Sugars*. Edward Arnold, London, 1929.
25. Hehre, E. J., *J. Biol. Chem.*, **177**, 267 (1949).
26. Hestrin, S., *Wallerstein Labs. Commun.*, **11**, 193 (1948); *ibid.*, **12**, 45 (1949).
27. Hestrin, S., and Avineri-Shapiro, S., *Biochem. J.*, **38**, 2 (1944).
28. Hudson, C. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 1537 (1938).
29. Isbell, H. S., and Pigman, W. W., *J. Research Natl. Bur. Standards*, **20**, 773 (1938).
30. Jackson, E. L., and Hudson, C. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 994 (1937); **62**, 958 (1940). Hann, R. M., Maclay, W. D., and Hudson, C. S., *ibid.*, **61**, 2432 (1939).
31. Kagan, B. O., Latker, S. N., and Zfasman, E. M., *Biokhimiya*, **7**, 92 (1942).
32. Kalckar, H. M., *Chem. Revs.*, **28**, 71 (1941).
33. Kgtz, J., Hassid, W. Z., and Doudoroff, M., *Nature*, **161**, 96 (1948).
34. Kriukova, N., *Biokhimiya*, **5**, 574 (1940).
- 34a. Kurssanov, A. L., in *Advances in Enzymology*, Vol. I. Interscience, New York, 1941, p. 329.

35. Kurssanov, A., and Kriukova, N., *Biokhimiya*, **4**, 229 (1939).
36. Lebedew, A., and Dikanowa, A., *Z. physiol. Chem.*, **231**, 271 (1935).
37. Lipmann, F., in *Advances in Enzymology*, Vol. I. Interscience, New York, 1941, p. 99.
38. McCready, R. M., and Hassid, W. Z., *Plant Physiol.*, **16**, 599 (1941).
39. Meagher, W. A., and Hassid, W. Z., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 2135 (1946).
40. Meyerhof, O., and Green, H., *J. Biol. Chem.*, **178**, 655 (1949).
41. Monod, J., and Torriani, A., *Compt. rend.*, **227**, 240 (1948).
42. Oparin, A., and Kursanov, A., *Biochem. Z.*, **239**, 1 (1931).
43. Potter, A. L., Sowden, J. C., Hassid, W. Z., and Doudoroff, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 1751 (1948).
44. Purves, C. B., and Hudson, C. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 1170 (1937).
45. Raybin, H. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **55**, 2603; **59**, 1402 (1937).
46. Wolochow, H., Putman, E. W., Doudoroff, M., Hassid, W. Z., and Barker, H. A., *J. Biol. Chem.*, **180**, 1237 (1949).

SOME ASPECTS OF STREPTOMYCIN AND OTHER *STREPTOMYCES* ANTIBIOTICS

By NORMAN G. BRINK and KARL FOLKERS,
Rahway, New Jersey

CONTENTS

I. Introduction.....	145
II. Streptomycin.....	146
A. Isolation.....	146
B. Nomenclature.....	147
C. Molecular Formula and Properties.....	149
D. Streptidine.....	149
E. Derivatives of Streptobiosamine.....	151
F. <i>N</i> -Methyl- <i>L</i> -Glucosamine.....	152
G. Streptose.....	152
H. Stereochemistry of Streptose.....	154
I. Structure of Streptobiosamine.....	154
J. Linkage between Streptidine and Streptobiosamine.....	155
K. The Maltol Rearrangement.....	156
L. Synthesis of <i>N</i> -Methyl- <i>L</i> -Glucosamine.....	157
M. Syntheses of Streptamine and Streptidine.....	158
N. Relationship of Structure of Streptomycin to Antibiotic Activity.....	160
O. A Site of Action of Streptomycin.....	161
III. Mannosidostreptomycin.....	161
IV. Chloromycetin (Chloramphenicol).....	162
V. Aureomycin.....	164
VI. Neomycin.....	164
References.....	164

I. Introduction

It is the purpose of this review to describe and correlate the salient features of the isolation and chemical research which have been carried out on some of the outstanding antibiotics produced by the *Streptomyces* group of organisms, with particular reference to streptomycin. It is not intended to include all of the literature in this field which has appeared from January, 1944, to the present. For a detailed review of the chemistry of streptomycin, the reader is referred to the article by Lemieux and Wolfrom (1).

In describing completed organic structure work on natural products, one may either develop the molecular formula into a structural formula on a historical basis or present the completed, known struc-

tures in abbreviated chemical equations. The latter style is used in this review.

Let us look back now to the status of antibiotic research just prior to January, 1944. Penicillin was an outstandingly valuable antibiotic in clinical medicine, but there were limitations to its use. Most of the antibiotics known up to 1944, such as penicillin, gramicidin, actinomycin, etc., had been observed to act largely upon gram-positive bacteria. Particularly in the case of penicillin, the activity upon gram-negative organisms was found to be highly selective and limited, or much larger quantities were needed to inhibit these bacteria. New substances were needed which would be highly active against gram-negative bacteria, and which would not be toxic.

Streptothricin had been characterized microbiologically by Waksman and Woodruff (2) in 1943. It occupied a prominent place among antibiotics which act selectively against both gram-positive and gram-negative bacteria, but unfortunately it too had very little activity against a number of both gram-negative and gram-positive groups.

A search among the actinomycetes for organisms which are antagonistic to gram-negative bacteria and which might yield useful antibiotic substances was started. Dr. Waksman and his students had organized a screening program to explore empirically the best leads they knew—including actinomycetes. *Streptomyces lavendulae*, an actinomycete, produces streptothricin.

II. Streptomycin

After examination of a large number of cultures from soils, composts, and culture collections, it was found that certain strains of *Streptomyces griseus* produced a substance, designated streptomycin, with antibiotic activity against various gram-negative organisms which was greater than that exhibited by streptothricin. One strain came from field soil and another from the throat of a chicken. This discovery was published in January, 1944, by Schatz, Bugie and Waksman (3), and from then until the end of 1948 nearly 1200 papers on streptomycin appeared in scientific journals.

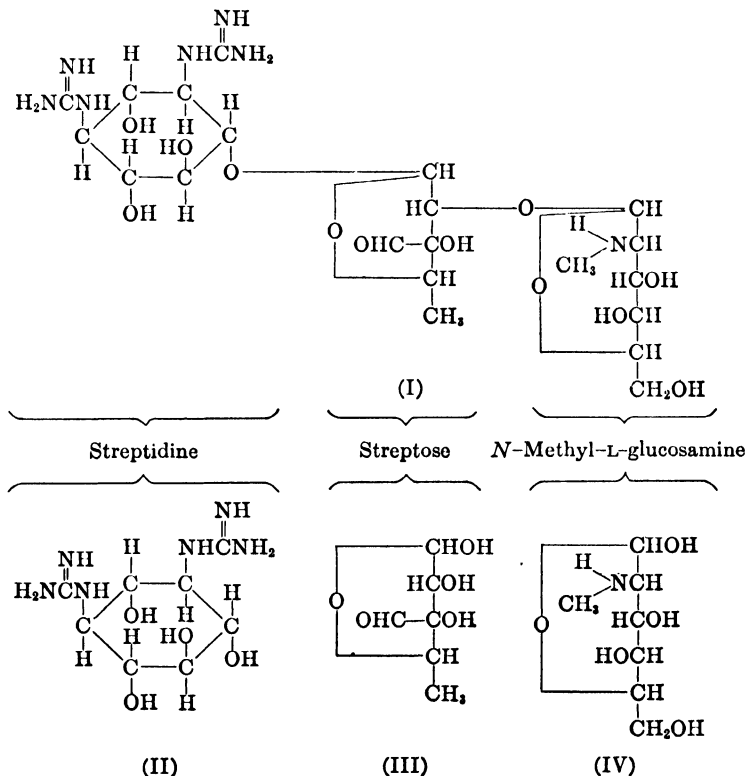
A. ISOLATION

Within a year after the discovery of streptomycin in 1944, this antibiotic was isolated essentially simultaneously in three chemical laboratories. These isolation researches yielded crystalline salts of streptomycin, which in turn afforded pure although amorphous

streptomycin trihydrochloride for biological research and for the elucidation of its chemistry. The crystalline salts were the reineckate (4,5), the helianthate (6), and the calcium chloride double salt (7). The investigators were cognizant of the possible presence of more than one active substance in the crude concentrates, but concluded that they all had the same active principle. In 1948, experimental conditions were found for obtaining streptomycin trihydrochloride dihydrate in crystalline form (8).

B. NOMENCLATURE

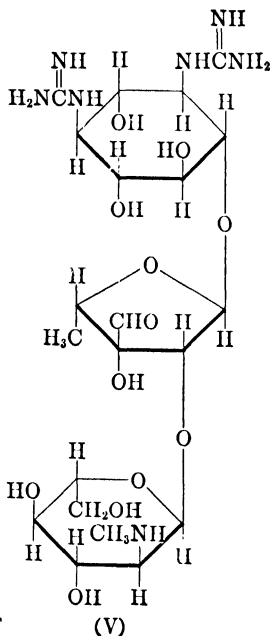
The combined chemical and stereochemical evidence from several research laboratories now permits formula I to be written for the structure of streptomycin. The nomenclature used for the component parts of the molecule is indicated by the braces for the formulas.



Streptidine (II) is the inositol-like substance having two guanido groups. Streptose (III) is a unique branched-chain sugar with two aldehyde groups, a tertiary hydroxyl group, and a *C*-methyl group. *N*-Methyl-*L*-glucosamine (IV) is a 2-aminohexose. The disaccharide composed of streptose and *N*-methyl-*L*-glucosamine is designated streptobiosamine.

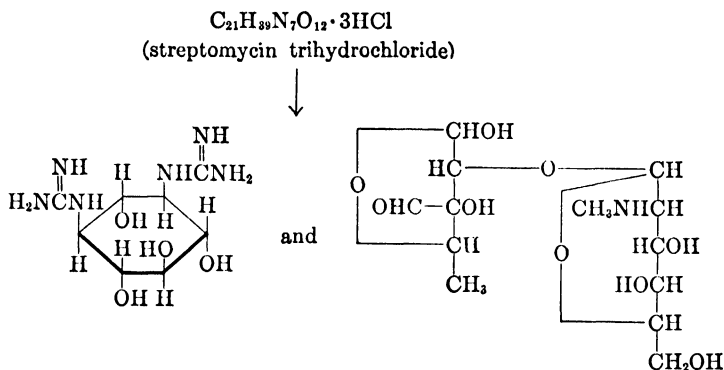
Streptomycin is equivalent to streptidine, streptose, and *N*-methyl-*L*-glucosamine when two molecules of water are deducted. Although this structure for streptomycin may be considered complete, including the configuration of all the asymmetric centers, confirmatory evidence for certain points of stereochemistry would be of interest.

Structure V is a Haworth perspective formula for streptomycin. This formula has certain advantages for visualizing stereochemical



relationships. For example, it is clear that the formyl group of the streptose moiety in streptomycin could exist not only free but in inter-moiety hemi-acetal formation. Such a hemi-acetal would have a large ring and be labile. There is evidence for such internal cyclizations.

The glycosidic linkage between the streptidine and the streptose moieties of streptomycin is much more susceptible to cleavage than the glycosidic linkage between the streptose and the *N*-methyl-L-glucosamine moieties. Consequently, streptomycin may be cleaved by a variety of reactions, such as acid hydrolysis, to yield streptidine and streptobiosamine. In fact, the hydrolysis of streptomycin in sulfuric acid solution at room temperature is a preparative reaction for streptidine sulfate:



C. MOLECULAR FORMULA AND PROPERTIES

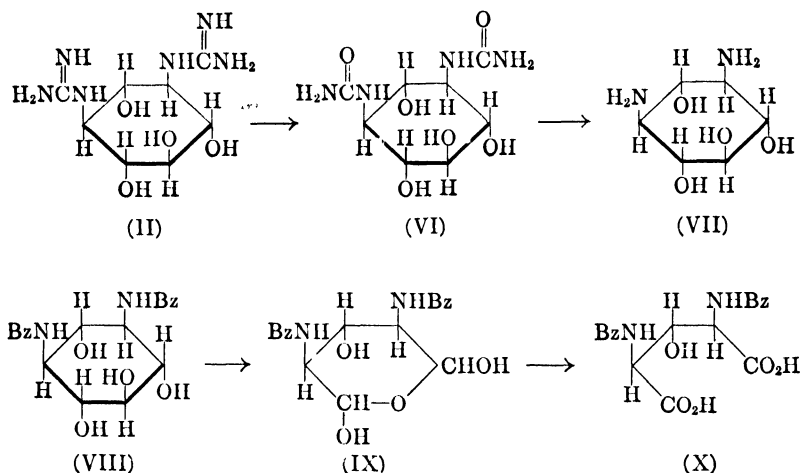
Elementary analyses and physical measurements on a number of the crystalline salts previously mentioned suggested the formula $C_{21}H_{37-39}N_7O_{12} \cdot 3HX$ for streptomycin salts. Only when the compositions of streptidine and of some suitable streptobiosamine derivatives could be interpreted together was the formula $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ for streptomycin definitely established (9).

It was early observed that streptomycin contained a reactive carbonyl group in addition to the three basic groups shown by titration. The antibiotic was inactivated by carbonyl group reagents, and streptomycin oxime and semicarbazone were prepared (10).

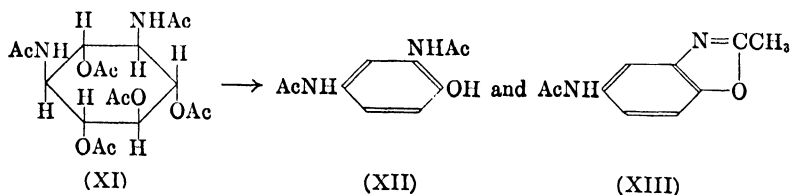
D. STREPTIDINE

Aqueous acid hydrolysis of streptomycin yielded the diacidic base, streptidine (II). By stepwise alkaline degradation, it was converted first into strepturea (VI) and then to streptamine (VII) (11,12).

When the *N,N'*-dibenzoyl derivative of streptamine (VIII) was oxidized with periodate, a hydrated and cyclized dialdehyde (IX) was obtained as a crystalline oxidation product. Oxidation of this aldehyde with bromine gave an α,γ -dibenzamido- β -hydroxyglutaric acid (X) (12).



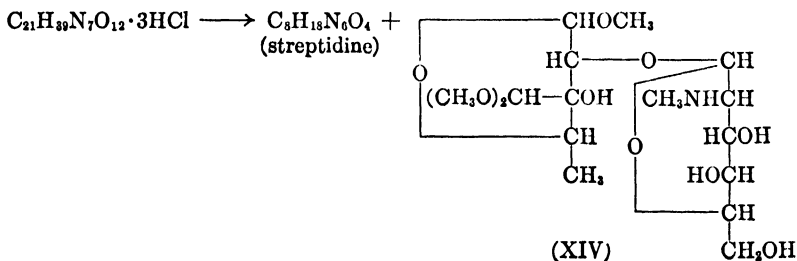
Thermal treatment of hexaacetylstreptamine (XI) gave high yields of 2,4-diacetamidophenol (XII) and 5-acetamido-2-methylbenzoxazole (XIII) (13).



Streptidine is optically inactive; hence, it is a *meso* form. These reactions of alkaline hydrolysis, oxidation and pyrolysis provided the principal evidence for the structure of streptidine as a 1,3-diguanido-2,4,5,6-tetrahydroxycyclohexane.

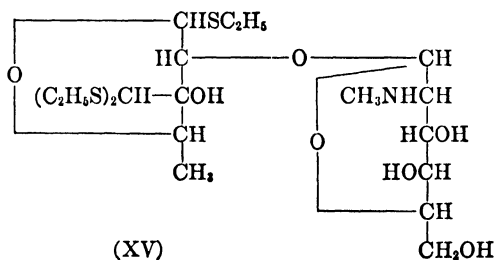
E. DERIVATIVES OF STREPTOBIOSAMINE

The facile cleavage of streptomycin in aqueous acid has been mentioned. Treatment of streptomycin with methanolic hydrogen chloride (10) also cleaved the same glycosidic linkage and yielded streptidine and methyl streptobiosaminide dimethyl acetal (XIV). In



this reaction, the free formyl group of the streptose moiety was converted into an acetal group. The crystalline tetraacetyl derivative of this disaccharide has historical interest since it was the first streptobiosamine derivative characterized in crystalline form.

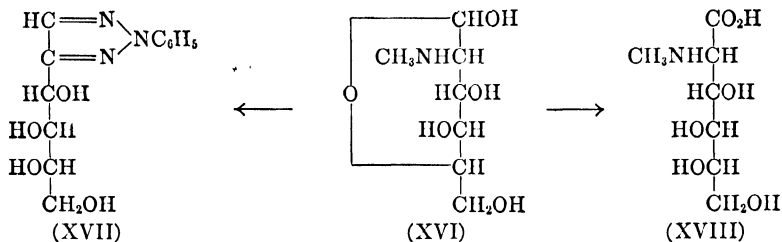
Cleavage of streptomycin with ethyl mercaptan and hydrogen chloride afforded the analogous ethyl thiostreptobiosaminide diethyl mercaptal (XV) (9,14). This reaction of streptomycin with ethyl



mercaptan was very satisfactory and could be carried out on concentrates of streptomycin. This thioglycoside mercaptal was an important degradation product and derivative of streptobiosamine since it served as a starting point for the elucidation of much of the structure of the disaccharide.

F. *N*-METHYL-L-GLUCOSAMINE

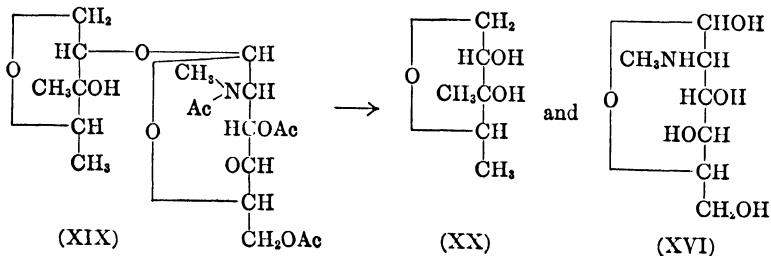
Hydrolysis of methyl streptobiosaminide dimethyl acetal (XIV) in boiling concentrated hydrochloric acid led to the decomposition of the streptose moiety of the disaccharide and the isolation, after acetylation, of the pentaacetyl derivative of a methylaminohexose. This compound was readily hydrolyzed to the free sugar (XVI). The new sugar gave a phenylosazone which was converted to a phenyloso-



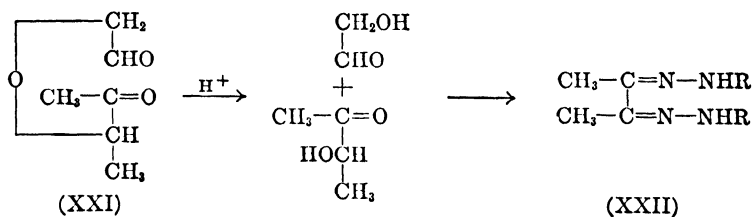
triazole (XVII). This derivative melted at the same temperature as the known *D*-glucose phenylosotriazole, and the specific rotation was equal in magnitude, but opposite in sign. Oxidation of the new sugar with mercuric oxide gave a nitrogen-containing acid (XVIII) having the same melting point as the known *N*-methyl-*D*-glucosamic acid, and an equal but opposite specific rotation. It was thus concluded that these degradation products were related to *L*-glucose, and the hexosamine from streptomycin was *N*-methyl-*L*-glucosamine (15).

G. STREPTOSE

Hydrogenolysis of ethyl tetraacetylthiostreptobiosaminide diethyl mercaptal (XV) with Raney nickel catalyst gave tetraacetylbis-desoxystreptobiosamine (XIX), which upon hydrolysis with sulfuric acid afforded *N*-methyl-*L*-glucosamine and a new compound design-

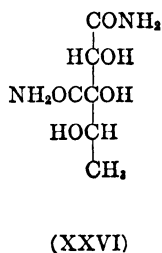
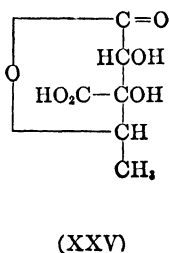
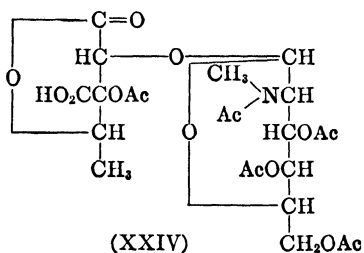
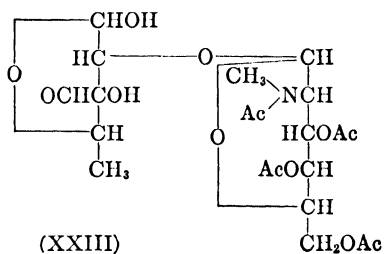


nated as bisdesoxystreptose (XX) (16,17). Oxidation of bisdesoxystreptose with one mole of periodate yielded a dicarbonyl oxidation product (XXI) which was readily hydrolyzed by mild acid treatment.



The acetoin which was formed was characterized by several osazones of biacetyl (XXII). These reactions revealed much of the structure of streptose.

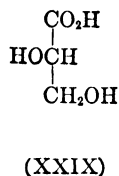
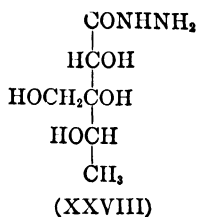
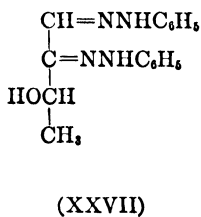
When ethyl tetraacetylthiostreptobiosaminide diethyl mercaptal was hydrolyzed with aqueous mercuric chloride in the presence of a carbonate buffer, tetraacetylstreptobiosamine (XXIII) was obtained. The product was oxidized by bromine, and, after acetylation, penta-



acetylstreptobiosamic acid monolactone (XXIV) was obtained. This lactone was hydrolyzed with acid and streptosonic acid monolactone (XXV) was isolated. The monolactone was further characterized by conversion to the diamide (XXVI). The structures of these streptosonic acid derivatives were revealed by periodate oxidations. Thus, the monolactone reacted with two equivalents of periodic acid to yield oxalic acid and glyoxylic acid. The diamide upon periodate oxidation consumed two equivalents of reagent and yielded acetaldehyde (18).

H. STEREOCHEMISTRY OF STREPTOSE

Elucidation of the stereochemistry of streptose was forthcoming from several laboratories. The reaction of streptobiosamine with phenylhydrazine in aqueous solution yielded the phenylosazone of 4-desoxy-L-erythrose (XXVII), showing that carbon atom four of streptose possesses the L-configuration (19).



Bisdesoxystreptose formed a complex with boric acid, demonstrating that in streptose the C₂- and C₃-hydroxyl groups have a *cis* configuration (16,17).

The hydrazide of dihydrostreptosonic acid (XXVIII) was prepared and found to be dextrorotatory, and in consideration of Hudson's rules of rotation, the C₂-hydroxyl group of streptose was assigned to the right (20).

The configuration of the groups about C₂ of streptose was confirmed by the degradation of *N*-acetyltetrahydrostreptobiosamine to L-glyceric acid (XXIX) (21).

I. STRUCTURE OF STREPTOBIOSAMINE

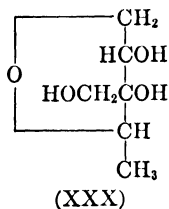
The hydrolysis of streptobiosamine to derivatives of streptose and *N*-methyl-L-glucosamine has been described. It was observed that *N*-acetylbisdesoxystreptobiosamine did not reduce Fehling solution,

and hence concluded that the hexosamine was attached to streptose through carbon atom one of the amino sugar (22). It was also found that tetraacetylbisdesoxystreptobiosamine possessed a free tertiary hydroxyl group in the streptose moiety, leaving only carbon atom two of the streptose portion available for the attachment of *N*-methyl-L-glucosamine (16,17). Periodate oxidation studies (16,17) indicated a pyranose ring structure for the amino sugar moiety.

Application of Hudson's rules and the use of some assumptions led Lemieux, DeWalt, and Wolfrom (23) to conclude that both of the streptobiosamine glycosidic linkages in streptomycin possess the α -configuration.

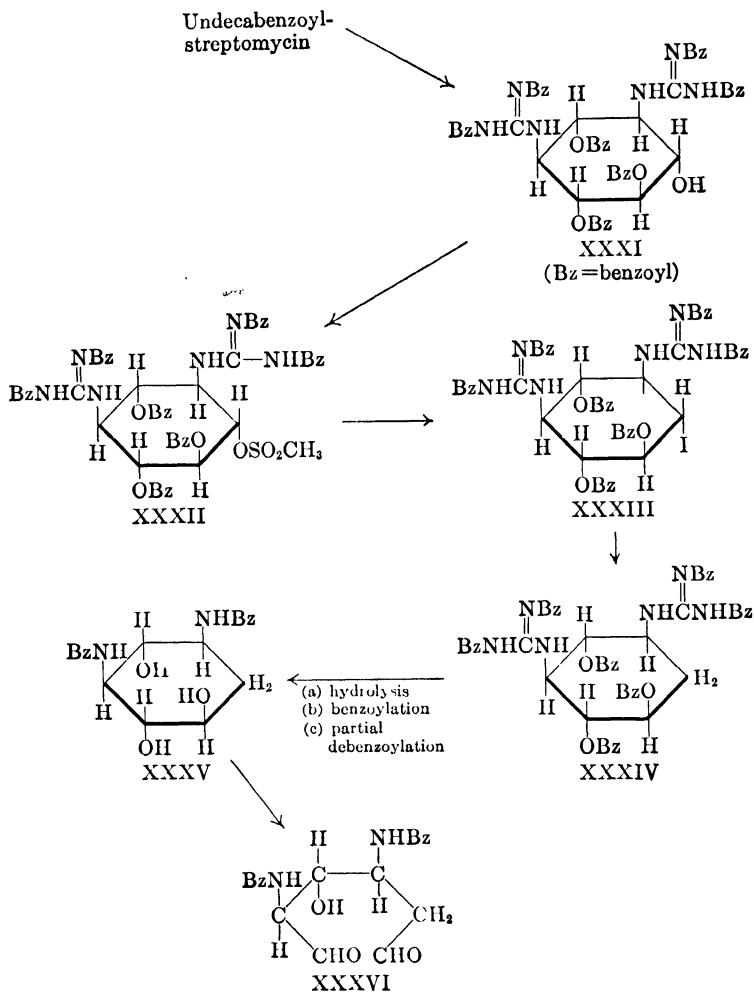
J. LINKAGE BETWEEN STREPTIDINE AND STREPTOBIOSAMINE

Proof of the linkage of streptidine to streptobiosamine through carbon atom one of streptose came from a series of reactions. Dihydrostreptomycin was degraded to dihydrodesoxystreptose (XXX) (17,22). The liberation of one mole of formaldehyde in the reaction



of dihydrodesoxystreptose with periodate was consistent with the previously derived conclusion that the C₁-aldehyde group of streptose is the one involved in the linkage to streptidine.

The evidence which showed that the linkage of streptobiosamine is to position four of streptidine was as follows: Completely benzoylated streptomycin was cleaved hydrolytically to heptabenzoylstreptidine (XXXI). From this product were prepared in succession the mesyl derivative (XXXII), the iodo derivative (XXXIII), and then heptabenzoyl desoxystreptidine (XXXIV). The latter compound was converted by hydrolysis, benzoylation, and partial debenzoylation to *N,N'*-dibenzoyl desoxystreptamine (XXXV). The *N,N'*-dibenzoyl desoxystreptamine reacted with one mole of periodate to form α,γ -dibenzamido- β -hydroxyadipaldehyde (XXXVI) (24,25):

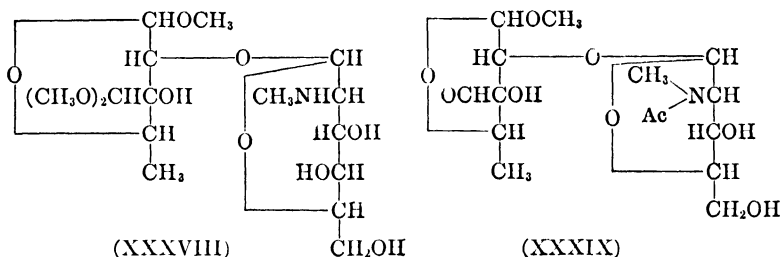
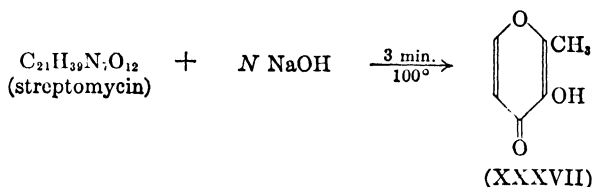


K. THE MALTOL REARRANGEMENT

Shortly after the isolation of streptomycin, it was observed that when streptomycin was treated with aqueous alkali under relatively mild conditions the γ -pyrone, maltol, XXXVII, was formed (26).

It was shown later that maltol could be formed from methyl streptobiosaminide dimethyl acetal (XXXVIII) and also from

methyl *N*-acetylstreptobiosaminide (XXXIX) (18,27):



It was evident that maltol originated from the streptose moiety of streptomycin and its streptobiosamine degradation products. Since the streptose moiety has a branched carbon skeleton and maltol has a straight carbon skeleton, it was also evident that a carbon-carbon rearrangement must have taken place in these reactions giving maltol. Such rearrangements of sugars in the presence of alkali are well known. It has been concluded that this rearrangement of the streptose moiety to maltol takes place only when the aldehyde group at carbon atom one of streptose is glycosidically combined, and when the other aldehyde group is free or potentially free.

The conversion of streptomycin to maltol can be made to take place in a 75% yield and the reaction has utility in colorimetric determinations of streptomycin.

L. SYNTHESIS OF *N*-METHYL-*L*-GLUCOSAMINE

N-Methyl-*L*-glucosamine was synthesized as follows (15,28): *L*-Arabinose (XL) was converted by reaction with methylamine and hydrogen cyanide to the methylaminonitrile (XLI). Hydrolysis of the nitrile with concentrated hydrochloric acid gave *N*-methyl-*L*-glucosamic acid (XLII). Lactonization and reduction with sodium

amalgam yielded *N*-methyl-L-glucosamine (XLIII). Acetylation of the latter product gave the pentaacetyl derivative (XLIV).

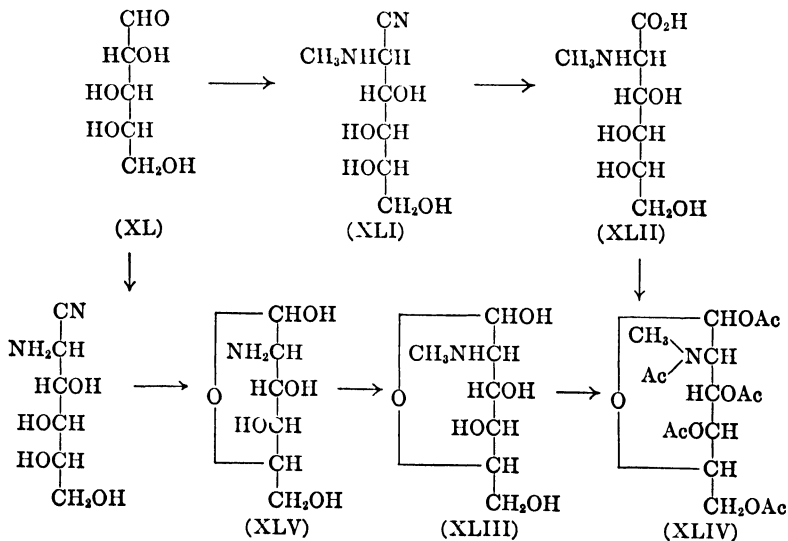
Alternatively (28), L-arabinose was converted into L-glucosamine (XLV) by treatment with ammonia and hydrogen cyanide followed by hydrolysis, lactonization, and reduction. Treatment of L-glucosamine with dimethyl sulfate, followed by acetylation, yielded pentaacetyl-*N*-methyl-L-glucosamine.

The synthetic *N*-methyl-L-glucosamine and its pentaacetyl derivative were identical with the degradation products.

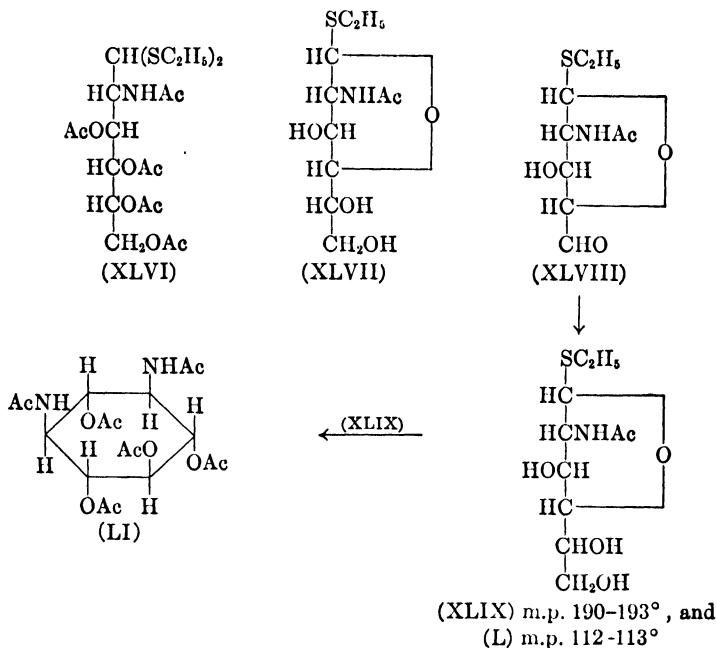
The configuration about carbon atom two was established by the methylation of D-glucosamine to give *N*-methyl-D-glucosamine. The hydrochloride and pentaacetyl derivative of this D-compound had the same melting points as the corresponding derivatives of the degradation products and the synthetic products from L-arabinose, and the specific rotations were equal in magnitude, but opposite in sign.

M. SYNTHESSES OF STREPTAMINE AND STREPTIDINE

Streptamine was synthesized (29) by an interesting series of reactions which also elucidated its configuration, as well as that of streptidine.



Pentaacetyl-D-glucosamine diethyl thioacetal (XLVI) was partially deacetylated and then treated with mercuric chloride-mercuric oxide to give ethyl 2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucothiofuranoside (XLVII). Oxidation of the latter compound with lead tetraacetate yielded an aldehyde (XLVIII) which was condensed with nitro-methane to two products: ethyl 2-acetamido-6-nitro-2,6-dideoxy- α -D-glucothiofuranoside and ethyl 2-acetamido-6-nitro-2,6-dideoxy- β -L-idiothiofuranoside (XLIX and L).



The ethyl mercapto group of the higher melting isomer was hydrolyzed with mercuric chloride and the resultant nitro sugar was allowed to cyclize in barium hydroxide solution. The barium salt of the cyclized sugar was hydrogenated with Raney nickel catalyst, and the reduction products were acetylated. One acetylated product was identical with hexaacetylstreptomycin (LI) from streptomycin.

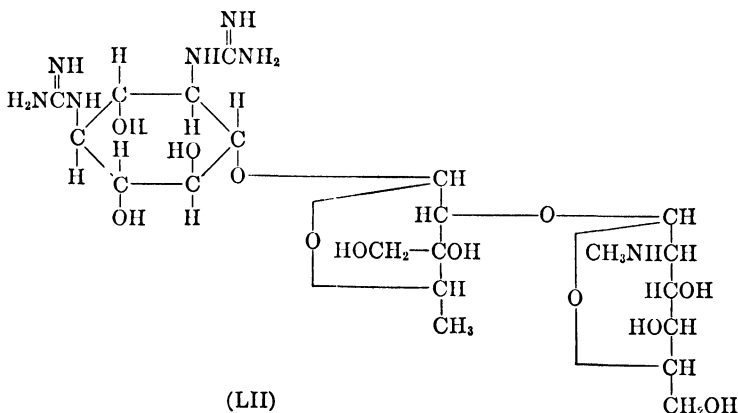
Wolfrom and Olin (29) have concluded that, since streptidine is a *meso* form, it possesses the all-*trans* configuration. The configuration at carbon atom two was deduced by analogy. A direct proof of this point would be of interest.

The synthesis of streptidine was completed (30) by the conversion of synthetic hexaacetylstreptamine into synthetic streptamine by saponification with aqueous sodium hydroxide. Treatment of synthetic streptamine in aqueous solution with *S*-methylisothiurea yielded synthetic streptidine.

Natural streptamine has also been converted into streptidine by heating at 155° an aqueous solution of streptamine hydrochloride and cyanamide (31).

N. RELATIONSHIP OF STRUCTURE OF STREPTOMYCIN TO ANTIBIOTIC ACTIVITY

Fragments of the molecule such as streptidine, streptobiosamine, and *N*-methyl-*L*-glucosamine were tested and found to have only negligible antibiotic activity. However, work on modifications of the molecule has been more fruitful medically. Dihydrostreptomycin (LII), in which the formyl group of the streptose moiety has been



reduced to a carbinol group, is significantly less toxic than streptomycin. There is an extremely low incidence of vestibular disturbances and less frequent allergic manifestations. Dihydrostreptomycin appears to have undiminished activity against *Mycobacterium tuberculosis*, and is being used clinically.

When the formyl group of the streptose moiety of streptomycin was oxidized to a carboxy group (32), the resulting product, streptomycinic acid, was antibiotically inactive.

When dihydrostreptomycin was hydrolyzed with alkali to convert

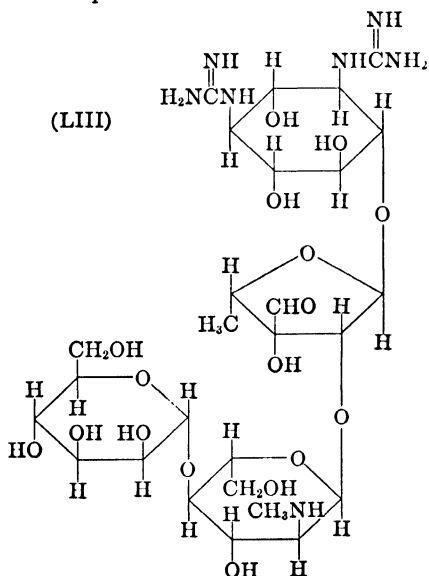
the guanido groups to amino groups, the product, designated dide-guanyldihydrostreptomycin (33), was also antibiotically inactive.

O. A SITE OF ACTION OF STREPTOMYCIN

Knowledge of the site of action of streptomycin might lead to a new chemotherapeutic agent. Mention may be made of a recent paper (34) on this subject. In a strain of *Escherichia coli*, threonine oxidation is stimulated by previous fumarate oxidation. This stimulating effect is prevented by the presence of streptomycin. Under suitable conditions, streptomycin can be shown to inhibit the oxidation of fumarate and pyruvate. Further, the mode of action of streptomycin is to inhibit the terminal respiration process. The terminal respiration process involves a pyruvate-oxalacetate condensation, and streptomycin exerts its activity close to this reaction.

III. Mannosidostreptomycin

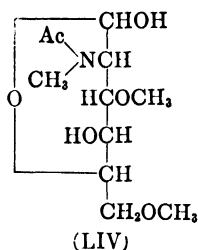
Mannosidostreptomycin occurs with streptomycin in certain broths and was separated from streptomycin chromatographically and through isolation as the reineckate (35). Mannosidostreptomycin has structure LIII; and, as the name indicates, it has a mannose moiety attached to streptobiosamine:



The key points in the determination of the structure of mannosidostreptomycin were as follows: Methanolysis gave methyl tetraacetyl-streptobiosaminide dimethyl acetal and α -methyl tetraacetyl-D-mannopyranoside. Another degradation using ethyl mercaptan and acetylation gave octaacetylstreptidine and the thioacetals of acetylated streptobiosamine and mannose.

Catalytic hydrogenation gave the dihydro derivative and this substance was hydrolyzed to a trisaccharide, isolated as a monoacetate. The trisaccharide was cleaved to yield derivatives of dihydrostreptobiosamine and mannose or to a disaccharide octaacetate. Hydrolysis of the latter compound to *N*-methyl-L-glucosamine and mannose derivatives showed that mannose was attached to *N*-methyl-L-glucosamine.

The linkage of mannose to position four of *N*-methyl-L-glucosamine was shown by the methylation and degradation of *N*-pentaacetyl-dihydropyranmannosidostreptomycin to triacetyl-3,6-dimethyl-*N*-methyl-L-glucosamine (LIV) and by the fact that the formation of streptobiosamine derivatives from mannosidostreptomycin requires a pyranose ring in the *N*-methyl-L-glucosamine moiety (36,37).



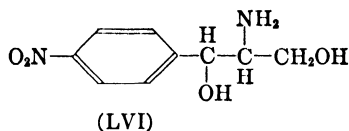
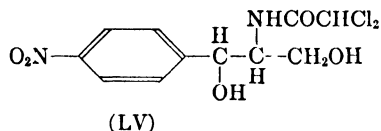
Completely benzoylated mannosidostreptomycin (38) was degraded to the same heptabenzoylstreptidine (XXXI), which was isolated from benzoylated streptomycin, thus evidencing that mannosidostreptobiosamine is also attached to position four of streptidine.

IV. Chloromycetin (Chloramphenicol)

Chloromycetin (chloramphenicol) is a recently discovered antibiotic produced by a *Streptomyces* organism, perhaps *S. lavendulae*.

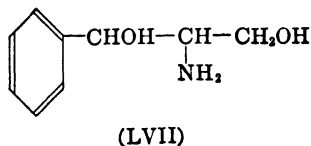
Although not very active against tuberculosis in animals, chloromycetin has shown high clinical efficacy in the treatment of infections produced by certain gram-negative organisms and by the rickettsiae. The antibiotic has been identified by its properties and reactions as *D-threo-N*-(1,1'-dihydroxy-1-*p*-nitrophenylisopropyl)-dichloroacetamide (LV) (39).

Chloromycetin showed an absorption spectrum closely resembling that of *p*-nitrotoluene; the presence of the nitro group was confirmed chemically. It gave a diacetyl derivative in which both acetyl groups were attached to oxygen. The substance did not react with periodate, but either acid or alkaline hydrolysis yielded dichloroacetic acid and a base (LVI) which consumed two moles of periodate to yield *p*-



nitrobenzaldehyde, ammonia, formaldehyde, and (presumably) formic acid. The relationship to (*l*)-*nor-pseudo*-ephedrine was suggested by the stability of the base and considerations of optical rotatory data.

In the synthesis of chloromycetin (40), benzaldehyde was condensed with β -nitroethanol and the product reduced catalytically to give the dihydroxy amine, LVII. This product, a mixture of two *dl*-



pairs, was separated; and one racemate was acetylated, nitrated, and hydrolyzed to yield the *dl*-base (LVI). Resolution with *d*-camphor-sulfonic acid and reaction with methyl dichloroacetate gave chloromycetin. Alternative syntheses (41) starting from acetophenone and from *p*-nitroacetophenone have also been reported.

V. Aureomycin

Another new antibiotic of great promise is aureomycin, isolated from *Streptomyces aureofaciens* by Duggar (42). It is active against both gram-positive and gram-negative organisms, and has been shown to be efficacious in the treatment of certain viral and rickettsial infections, and perhaps in amebiasis. Aureomycin, like chloromycetin, has the advantage that it can be administered orally. The name was derived from the golden color of the pure compound, as well as that of the microorganism which produces the antibiotic.

The structure of aureomycin has not yet been announced, but analyses of the hydrochloride and crystalline free base, together with certain properties, have been reported (43).

VI. Neomycin

Since the discovery of streptomycin, Dr. Waksman and his co-workers have continued their search for new antibiotics. Particular emphasis was placed in their screening program upon actinomycetes of the genus *Streptomyces*, and upon antibiotics active against streptomycin-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*.

As a result of this extensive microbiological research, the antibiotic activity of culture filtrates of *S. fradiae*, a soil organism, was selected for further detailed research. The active substance was designated "neomycin" by Waksman and Lechevalier (44). These authors reported that neomycin concentrates were active *in vivo* against various bacteria, both gram-positive and gram-negative. Little or no resistance to the concentrates was developed. They were of limited toxicity to animals. Moreover, considerable *in vitro* activity was observed against various forms of *M. tuberculosis*. The active substance was basic and thermostable.

Evidence has been obtained that the neomycin activity is due to more than one chemical entity (45). One of the active antibiotic principles, designated "Neomycin A" has recently been isolated in pure form (46). Preliminary studies on the pure material have shown it to be distinctly different chemically from streptomycin.

References

1. "The Chemistry of Streptomycin," in *Advances in Carbohydrate Chemistry*. Vol. III, Academic Press, New York, 1948.
2. Waksman, S. A., and Woodruff, H. B., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **49**, 207 (1942); *J. Bact.*, **46**, 299 (1943).

3. Schatz, A., Bugie, E., and Waksman, S. A., *ibid.*, **55**, 66 (1944).
4. Fried, J., and Wintersteiner, O., *Science*, **101**, 613 (1945).
5. Carter, H. E., Clark, R. K., Dickman, S. R., Loo, Y. H., Skell, P. S., and Strong, W. A., *J. Biol. Chem.*, **160**, 337 (1945).
6. Kuehl, F. A., Peck, R. L., Walti, A., and Folkers, K., *Science*, **102**, 34 (1945).
7. Peck, R. L., Brink, N. G., Kuehl, F. A., Flynn, E. H., Walti, A., and Folkers, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 1866 (1945).
8. Heuser, L. J., Dolliver, M. A., and Stiller, E. T., *ibid.*, **70**, 2833 (1948).
9. Kuehl, F. A., Flynn, E. H., Brink, N. G., and Folkers, K., *ibid.*, **68**, 2096 (1946).
10. Brink, N. G., Kuehl, F. A., and Folkers, K., *Science*, **102**, 506 (1945).
11. Peck, R. L., Graber, R. P., Walti, A., Peel, E. W., Hoffhine, C. E., and Folkers, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 29 (1946).
12. Carter, H. E., Clark, R. K., Dickman, S. R., Loo, Y. H., Meek, J. S., Skell, P. S., Strong, W. A., Alberi, J. T., Bartz, Q. R., Rinkley, S. B., Crooks, H. M., Hooper, I. R., and Rebstock, M. C., *Science*, **103**, 540 (1946).
13. Peck, R. L., Hoffhine, C. E., Peel, E. W., Graber, R. P., Holly, F. W., Mozingo, R., and Folkers, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 776 (1946).
14. Hooper, I. R., Klemm, L. H., Polglase, W. J., and Wolfrom, M. L., *ibid.*, **68**, 2120 (1946).
15. Kuehl, F. A., Flynn, E. H., Holly, F. W., Mozingo, R., and Folkers, K., *ibid.*, **68**, 536 (1946); **69**, 3032 (1947).
16. Brink, N. G., Kuehl, F. A., Flynn, E. H., and Folkers, K., *ibid.*, **68**, 2405 (1946).
17. Brink, N. G., Kuehl, F. A., Flynn, E. H., and Folkers, K., *ibid.*, **70**, 2085 (1948).
18. Kuehl, F. A., Flynn, E. H., Brink, N. G., and Folkers, K., *ibid.*, **68**, 2679 (1946).
19. Fried, J., Walz, D. E., and Wintersteiner, O., *ibid.*, **68**, 2746 (1946).
20. Kuehl, F. A., Bishop, M. N., Flynn, E. H., and Folkers, K., *ibid.*, **70**, 2613 (1948).
21. Wolfrom, M. L., and DeWalt, C. W., *ibid.*, **70**, 3148 (1948).
22. Kuehl, F. A., Flynn, E. H., Brink, N. G., and Folkers, K., *ibid.*, **68**, 2096 (1946).
23. Lemieux, R. U., DeWalt, C. W., and Wolfrom, M. L., *ibid.*, **69**, 1838 (1947).
24. Kuehl, F. A., Peck, R. L., Hoffhine, C. E., Peel, E. W., and Folkers, K., *ibid.*, **69**, 1234 (1947).
25. Peck, R. L., Kuehl, F. A., Hoffhine, C. E., Peel, E. W., and Folkers, K., *ibid.*, **70**, 2321 (1948).
26. Schenck, J. R., and Spielman, M. A., *ibid.*, **67**, 2276 (1945).
27. Brink, N. G., Kuehl, F. A., Flynn, E. H., and Folkers, K., *ibid.*, **68**, 2557 (1946).
28. Kuehl, F. A., Flynn, E. H., Holly, F. W., Mozingo, R., and Folkers, K., *ibid.*, **69**, 3032 (1947).
29. Wolfrom, M. L., and Olin, S. M., Abstracts of Papers, 113th Meeting, Am. Chem. Soc., April, 1948, p. 5Q.
30. Wolfrom, M. L., and Polglase, W. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 1672 (1948).
31. Holly, F. W., Mozingo, R., and Folkers, K., *ibid.*, **70**, 3944 (1948).
32. Fried, J., and Wintersteiner, O., *ibid.*, **69**, 79 (1947).
33. Wolfrom, M. L., and Polglase, W. J., *ibid.*, **70**, 2835 (1948).
34. Umbreit, W., *J. Biol. Chem.*, **177**, 703 (1949).
35. Fried, J., and Titus, E., *ibid.*, **168**, 393 (1947).

36. Fried, J., and Stavely, H. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 1549 (1947).
37. Stavely, H. E., and Fried, J., *ibid.*, **71**, 135 (1949).
38. Peck, R. L., Hoffhine, C. E., Gale, P., and Folkers, K., *ibid.*, **70**, 3968 (1948).
39. Rebstock, M. C., Crooks, H. M., Controulis, J., and Bartz, Q. R., *ibid.*, **71**, 2458 (1949).
40. Controulis, J., Rebstock, M. C., and Crooks, H. M., *ibid.*, **71**, 2463 (1949)
41. Long, L. M., and Troutman, H. D., *ibid.*, **71**, 2469, 2473 (1949).
42. Duggar, B. M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 177 (1948).
43. Broschard, R. W., Dornbush, A. C., Gordon, S., Hutchings, B. L., Kohler, A. R., Krupa, G., Kushner, S., LeFennine, P. V., and Pidacks, C., *Science*, **109**, 199 (1949).
44. Waksman, S. A., and Lechevalier, H. A., *ibid.*, **109**, 305 (1949).
45. Swart, D., Hutchinson, E. A., and Waksman, S. A., *in press*.
46. Peck, R. L., Hoffhine, C. E., Gale, P., and Folkers, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2590 (1949).

PROBLEME DES CITRONENSÄURECYKLUS

von C. MARTIUS, *Tübingen*, und F. LYNEN, *München*

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung.....	167
II. Citronensäurecyklus und Acetatabbau in der Hefe	169
A. Die Bildung von Citronensäure in Hefe.....	169
B. Versuche über den Abbau von Citronensäure und C ₄ -Dicarbon- säuren in Hefe.....	173
Über den Abbau der Essigsäure im Tierkörper.....	176
III. Der Mechanismus der Kondensationsreaktion	177
A. Nachweis einer "Aktivierung" der Essigsäure.....	177
B. Nachweis eines "aktiven" 2C-Fragmentes beim Pyruvatabbau in tierischem Gewebe.....	180
C. Citronensäurebildung aus Acetessigsäure und anderen β -Keto- säuren.....	182
D. Die Oxydation der Fettsäuren.....	186
E. Die Natur der "aktivierten" Essigsäure.....	188
IV. Aconitase.....	190
A. Einleitung.....	190
B. Vorkommen, Eigenschaften und Beeinflussung des Fermentes ..	191
C. Substrate und Kinetik der Aconitase.....	192
D. Der "unsymmetrische" Abbau der Citronensäure.....	196
V. Oxalbernsteinsäure—Ochoa-Reaktion.....	199
A. Darstellung und Eigenschaften der Oxalbernsteinsäure	199
B. Oxalbernsteinsäure-Carboxylase.....	202
C. Carboxylierung von α -Ketoglutarsäure zu Oxalbernsteinsäure (Ochoa-Reaktion).....	208
VI. Effektoren der Fermente des Citronensäurecyklus	213
Literatur.....	217
Nachtrag bei der Korrektur.....	221

I. Einleitung

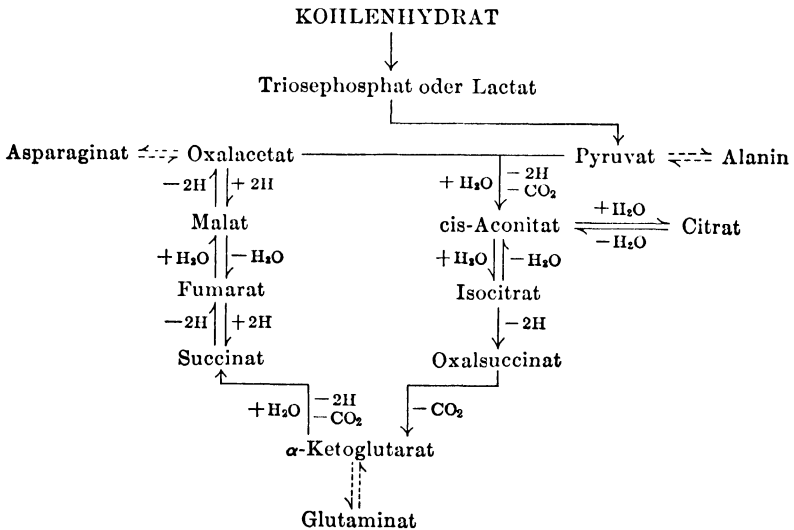
Es ist eine der wesentlichsten Erkenntnisse der modernen Stoffwechsellhre, dass der biologische Abbau bei allen wichtigen Nahrungstoffen mit einer Spaltung der Kohlenstoffkette in kleine Bruchstücke eingeleitet wird, deren endgültige Oxydation unter Entbindung von CO₂ dann erst im Citronensäurecyklus erfolgt.

Der erste Hinweis auf die Möglichkeit eines solchen cyklischen Abbaus findet sich in der vorläufigen Mitteilung von Martius und Knoop (1) in welcher der Übergang von Citronensäure in α -Ketoglutarsäure beschrieben wurde. Darin wurde weiter ausgeführt:

“. . . Wir haben wiederholt auf die grosse Bedeutung einer physiologischen Reversibilität der biochemischen Reaktionen hingewiesen. Deshalb erscheint uns die Tatsache von Interesse, dass auf diesem Wege als intermediäre Abbauprodukte auch die beiden Säuren auftreten, die sich nach unserer letzten Veröffentlichung so leicht wieder zu Citronensäure kondensieren: Oxallessigsäure und Brenztraubensäure.”

Die Arbeiten von Krebs (2) haben dann den Nachweis einer enzymatischen Bildung von Citronensäure aus Pyruvat und Oxalacetat im Taubenbrustmuskel gebracht, die durch die eingehende Arbeit von Hallmann (53) weiterhin gestützt und erhärtet wurde. Krebs hat weiterhin das Verdienst, die richtige Interpretation der Beobachtungen von Szent-Györgyi über die Malonathemmung der Gewebsatmung und ihre Aufhebung durch Fumarsäure im Rahmen der Citronensäurecyklus-Theorie gegeben zu haben.

In einer übersicht hat Krebs 1943 die experimentellen Befunde zusammengestellt, die dem von ihm wie folgt formulierten Cyklus als Basis dienen.



SCHEMA I
Tricarbonsäurecyklus nach Krebs

In diesem Schema waren die Reaktionen, die auf der linken Seite stehen, schon seit langem bekannt und auch hinsichtlich der dabei

beteiligten Enzyme weitgehend aufgeklärt. Dasselbe galt aber, worauf Krebs selbst hinweist, nur zum Teil für die der rechten Seite. Das Problem der den Cyklus einleitenden Kondensationsreaktion war noch völlig ungeklärt und ist es zum Teil auch heute noch. Eng damit verknüpft ist die Frage nach der Reihenfolge, in welcher die Tricarbonensäuren: Citronensäure, *cis*-Aconitsäure, Isocitronensäure in der Zelle entstehen. Ursprünglich hatte man in der Citronensäure das erste Reaktionsprodukt gesehen, diese Vorstellung aber auf Grund der Isotopenexperimente von Wood, Werkman, Hemingway, und Nier (15), sowie Evans und Slotin (16) aufgegeben. Die erstgenannten Autoren brachten einen modifizierten Cyklus in Vorschlag, wonach die Oxalacetat in der Enolform reagieren sollte und bei der Kondensation dann direkt *cis*-Aconitsäure entstehen sollte. Diese Theorie, die auf zu weit gehenden Schlüssen aus den Isotopenexperimenten aufgebaut war, ist heute schon wieder überholt und die Citronensäure in ihre alten Rechte wieder eingesetzt. Dieses Problem wird im Abschnitt "Aconitase" genauer diskutiert.

Schliesslich bestand auch beim Übergang Isocitrat \rightarrow α -Ketoglutarat noch eine Unklarheit. Denn ob die primär beim Dehydrierungsakt gebildete Oxalacetat spontaner Dekarboxylierung anheimfällt oder ob dabei ein Enzym im Spiel ist, stand 1943 noch nicht fest.

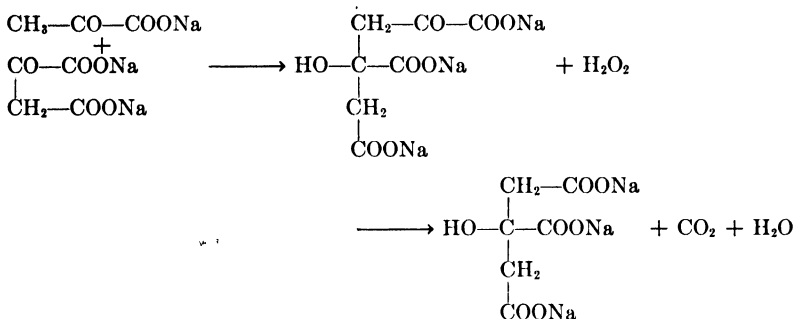
Die vorliegende Übersicht hat diese Probleme zum Inhalt. Sie stützt sich dabei z.T. auf experimentelle Befunde, die 1943 schon vorlagen, im Artikel von Krebs jedoch nicht berücksichtigt wurden; es handelt sich dabei insbesondere um Versuche, die nicht mit tierischem Gewebe sondern mit Hefe ausgeführt worden waren.

II. Citronensäurecyklus und Acetatabbau in der Hefe

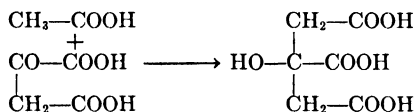
A. DIE BILDUNG VON CITRONENSÄURE IN HEFE

Wenn in den ersten Arbeiten über die biologische Synthese der Citronensäure aus den Endprodukten des anaeroben Kohlenhydratstoffwechsels im Tierkörper die Vermutung ausgesprochen wurde, dass die Kondensation zwischen Oxalacetat und Pyruvat erfolgt und die dabei gebildete Oxalacetat dann unter Dehydrierung in Citronensäure übergeht, so waren die Versuche von Knoop und Martius (3) über die Synthese *in vitro* dafür entscheidend gewesen. Denn im Tübinger Laboratorium hatte man gefunden, dass eine Mischung aus Pyruvat und Oxalacetat in schwach alkalischer Lösung konden-

siert und dann der Oxydation mit Hydroperoxyd nach Hollemann unterworfen in überraschend guter Ausbeute Citronensäure liefert.



Beim Versuch Essigsäure mit Oxalessigsäure zur Kondensation zu bringen, entstand dagegen keine Spur dieser Säure. Aber wie indifferent auch Essigsäure im Reagenzglas war, so lagen doch zum Zeitpunkt dieser Versuche schon mehrere Beobachtungen darüber vor, dass im Milieu der Zelle die Bedingungen andere sein müssen. So wusste man schon seit langem, dass viele Schimmelpilze den Aufbau der Citronensäure vom Äthylalkohol und von der Essigsäure aus vornehmen können (4) und sowohl Raistrick und Clark (5) wie auch Virtanen (6) hatten im Zusammenhang damit eine alte Hypothese von Claisen und Hori (7) übernommen, die besagte, dass Citronensäure durch eine einfache Aldolkondensation zwischen Essigsäure und Oxalessigsäure gebildet werden solle.



Aber erst Isotopenversuche von Sonderhoff und Thomas (8) erbrachten dafür den eindeutigen Beweis. Wie Wieland und Sonderhoff (9) entdeckt hatten, wird durch Hefe unter aeroben Bedingungen Acetat zu einem Teil in Bernsteinsäure und Citronensäure übergeführt. Insbesondere bei Verwendung von Bariumacetat—wie Virtanen und Sundman (10) später fanden auch bei Einsatz von Magnesiumacetat—lassen sich aus dem Reaktionsgemisch rund 10%, unter günstigen Bedingungen sogar bis zu 40% (11) der umgesetzten Essigsäure als Citronensäure isolieren.

Sonderhoff und Thomas wiederholten diese Versuche mit Tri-deutero-essigsäure. Das Ergebnis ihrer Deuterium-Analyse zeigt Tabelle I.

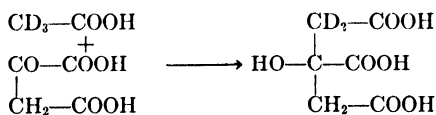
TABELLE I
DEUTERIUMGEHALT DER AUS TRIDEUTEROESSIGSÄURE GEBILDETEN
BERNSTEINSÄURE UND CITRONENSÄURE (8)

	Atom-% D	Atom-% D (direkt an Kohlenstoff gebunden)
Acetat eingesetzt.....	86.4	86.4
Acetat zurückgewonnen.....	87.2	87.2
Bernsteinsäure*.....	27.1	40.7
Citronensäure*.....	27.9	55.8

* Mittelwerte aus mehreren Versuchen.

Es zeigte sich ausserdem, dass die Hefe einen Teil des Acetates zum Aufbau von Zellsubstanzen und zwar von Fett und Kohlehydrat verwendet hatte. Das Fett enthielt im Mittel 22.7 Atom-% D, die Kohlenhydrate hingegen nur 1.6 Atom-% D.

Der hohe Deuteriumgehalt der Citronensäure deutet schon daraufhin, dass bei ihrer Synthese das Acetat direkt beteiligt sein muss und in der Tat stimmen Theorie und Experiment sehr gut überein, wenn man sich die Synthese als im Sinne der Claisenschen Hypothese erfolgt denkt.



Ein Teil des Deuteriums muss in diesen Versuchen übrigens über eine deuterierte Oxalessigsäure in das Molekül der Citronensäure eingeführt worden sein, denn wäre dies nicht der Fall, dürfte das Citrat nur genau halb so viel nicht austauschbares Deuterium enthalten wie das eingesetzte Acetat d.h. 43.2%. Tatsächlich wurde aber 12% mehr gefunden. Der Überschuss entstammt zweifellos der Oxal-essigsäure und stellt den Rest dar, der bei ihrer Bildung aus Bernsteinsäure, die ja laut Analyse viel Deuterium enthält, weder durch Dehydrierung noch durch Austausch verloren gegangen ist.

Den Experimenten von Sonderhoff und Thomas ist im allgemeinen nicht die Beachtung geschenkt worden, die sie verdient hätten.

Gewiss darf man Beobachtungen an Hefe nicht ohne weiteres auf den Tierkörper übertragen und umgekehrt. Aber es setzt sich doch immer mehr die Erkenntnis durch (12), "dass man berechtigt ist, alles was in der lebenden Zelle geschieht, aus einheitlichen und allgemein gültigen Prinzipien abzuleiten, handelt es sich um den Stoffwechsel der Hefe oder des Säugetieres." Und diese Erkenntnis war 1937 schon gut fundiert; hatten doch Arbeiten über die Hefegärung hinreichend bewiesen, dass in Hefe- und Muskelzelle die anaerobe Zuckerspaltung, wenn man vom letzten Schritt absieht, den gleichen Weg geht.

Schuld daran hatte vielleicht die Tatsache, dass Sonderhoff zwar den Deuteriumgehalt des Citrates nicht aber jenen der Bernsteinsäure vernünftig deuten konnte (8). Denn er ging von der Annahme aus, dass die Bernsteinsäure durch dehydrierende Verknüpfung aus zwei Molekeln Essigsäure entstanden sei und da hätte die Hefe D_4 -Succinat liefern müssen.

Diese Unstimmigkeit konnte erst beseitigt werden (13), nachdem Martius den Weg des Citratabbaus im Tierkörper gefunden hatte (14), und die Versuche von Wood, Hemingway, Werkman und Nier (15) sowie Evans und Slotin (16) ergeben hatten, dass im Cyklus gebildete Citronensäure weiterhin unsymmetrisch abgebaut wird. Die Bernsteinsäure der Hefe war eben nicht direkt aus Essigsäure entstanden sondern über den Cyklus, sie musste die Struktur $HOOC \cdot CH_2 \cdot CD_2 \cdot COOH$ besitzen und demnach halb soviel Deuterium enthalten wie die Essigsäure, von der man ausging. Tabelle I zeigt, dass die Analysen von Sonderhoff und Thomas dieser Forderung in nahezu idealer Weise genügen.

Einen Einwand, den Kamen gegen Lynens Interpretation der Isotopenversuche von Sonderhoff und Thomas, die Genese des Succinats betreffend, erhoben hat (17), können wir nicht anerkennen. Kamen ist der Ansicht, dass die D_2 -Bernsteinsäure auch entstanden sein könnte über eine D_4 -Bernsteinsäure, primär durch Dehydrierung zweier Molekeln Essigsäure gebildet, die dann sekundär infolge Einstellung eines reversiblen Gleichgewichtes zwischen Bernsteinsäure und Fumarsäure zwei Deuteriumatome gegen Wasserstoff ausgetauscht hätte. Aber es ist dann nicht recht einzusehen, warum dieser Austausch in vier verschiedenen Versuchen übereinstimmend gerade bei zwei Deuteriumatomen halt macht und nicht bis zum vollständigen Austausch des Deuteriums führt oder zumindest zu schwankenden Werten. Im übrigen hat sich Lynen bei seiner Diskussion der Isotopen-Versuche auf eine Reihe neuer Experimente mit gewöhnlicher Essigsäure stützen können, die alle für einen Abbau im Citronensäurecyklus sprachen. Heute ist die Diskussion in unserem Sinne entschieden, nachdem Weinhouse und

Millington auf Grund neuer Experimente unter Verwendung C^{13} -markierter Essigsäure, die Folgerungen Lynens bestätigen konnten (18).

Wenn somit die Arbeiten über den Abbau der Essigsäure durch Hefe, von Wieland und seinen Schülern in den Jahren 1932–1943 durchgeführt, letzten Endes die Erkenntnis brachten, dass Acetat im Citronensäurecyklus verbrannt wird, so war dies in zweifacher Hinsicht von Bedeutung. Einmal war es ein Beitrag zum Mechanismus der Citronensäuresynthese in der Zelle. Aber vielleicht noch wichtiger war es, dass sich damit eine Beziehung zwischen Citronensäurecyklus und Fettstoffwechsel aufgetan hatte, von dem man seit den grundlegenden Untersuchungen von Knoop über die β -Oxydation wusste (19), dass Essigsäure dabei beteiligt sein musste.

In der Folgezeit wurde diese Beziehung experimentell klargelegt, woran neben vielen anderen auch das Münchener Laboratorium beteiligt war. In Anbetracht der Bedeutung, die das Studium der Vorgänge in der Hefezelle dabei gespielt hat, sollen die betreffenden Experimente einen bevorzugten Platz einnehmen. Überdies schien es angebracht, gerade auch diese Versuche ein Mal zusammenzufassen, um die Behauptung zu widerlegen, die Krebs im Jahre 1943 aufgestellt hat (20):

“. . . to yeast, where so far no clues to the mechanism of acetate oxidation are available. Wieland and his collaborators claim to have shown that yeast can convert acetate into succinate and citrate. Even if this were correct, which is doubtful, it would not solve the problem of acetate oxidation. For both citrate and succinate are far too stable in yeast to be intermediary metabolites in a major oxidative process.”

B. VERSUCHE ÜBER DEN ABBAU VON CITRONENSÄURE UND C_4 -DICARBONSÄUREN IN HEFE

Lebende Hefe ist in der Tat zugesetztem Citrat und auch Succinat gegenüber nahezu wirkungslos (21). Wie Lynen und Neciullah erkannten (22), trägt allein die wenig durchlässige Zellwand daran die Schuld. Wird nämlich die Membran der Hefe durch Einfrieren in flüssiger Luft geschädigt (23–25), dann tritt ein kräftiger aerober Abbau des Citrats in Erscheinung, dessen Geschwindigkeit die des Essigsäureumsatzes in lebender Hefe nahezu erreicht (22). Er folgt dem von Martius vorgezeichneten Weg über Isocitronensäure, α -Ketoglutarensäure zu Bernsteinsäure, von denen die beiden letzteren als Reaktionsprodukt isoliert werden konnten (22,26).

Da in Hefe das gesamte Fermentsystem des Citronensäurecyklus nachgewiesen worden ist (27-30), bestanden in Würdigung der Isotopenversuche von Sonderhoff und Thomas keine grundsätzlichen Bedenken mehr gegen die Vorstellung, dass Essigsäure über den Citronensäurecyklus verbrannt wird.

Im übrigen ist lebende Hefe sowohl der Bernsteinsäure wie auch der Fumarsäure gegenüber nur dann wirkungslos, wenn diese in Form der neutralen Salze zugesetzt werden. Bei Zugabe der freien Säure dagegen tritt Oxydation ein (13). Denn die Membran der intakten Zelle ist zwar für das mehrfach geladene Anion impermeabel, nicht aber für die undissocierte Dicarbonsäure. Die besonders von Seiten der Mikrobiologen erhobenen Einwände gegen die Bedeutung des Citronensäurecyklus für den Stoffwechsel der Einzeller, die sich auf die schlechte Eignung der Citronensäure als Kohlenstoffquelle stützen, verlieren unter diesem Gesichtspunkt viel von ihrer Bedeutung. Die Berücksichtigung dieser Tatsache war auch entscheidend bei Versuchen über die Wirkung der Malonsäure auf den Hefestoffwechsel.

Hemmung des Essigsäureabbaus in Hefe durch Malonsäure. Bekanntlich hat Malonat, dessen selektive Hemmung der Succinodehydrase Quastel und Wooldridge beim Arbeiten mit Coli-Bakterien

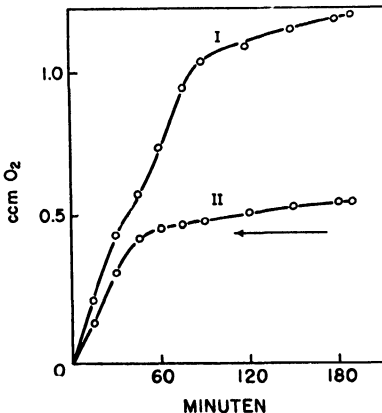


Abb. 1. Hemmung des Essigsäureabbaus durch Malonsäure: (I) ohne; (II) m/30-Malonsäure. 100 mg Hefe in 3 cm³ m/150-Äthylalkohol, 25°C. Der Pfeil gibt die O₂-Menge an, die für die Oxydation des zugesetzten Alkohols zur Essigsäure benötigt wird (13).

entdeckten (31), bei der Beweisführung von Krebs eine wichtige Rolle gespielt. Krebs fand, dass Malonat den Pyruvatabbau im Brustmuskel der Taube nahezu vollständig unterbindet, dass aber die Wirkung ausbleibt, wenn gleichzeitig Fumarat zugesetzt wird.

Die Oxydation ist dann allerdings unvollständig; es bildet sich neben CO_2 noch Succinat, wie man es erwarten muss, wenn Pyruvat über den Cyklus zur Oxydation kommt (20).

m/15 Malonat hat auf die Atmung der Hefe im allgemeinen und auf den Acetatabbau im besonderen keinen Einfluss (13,32). Kommt aber an Stelle des neutralen Salzes die freie Säure in Anwendung, so tritt bei gleicher Konzentration eine starke Hemmung in Erscheinung (13). Abb. 1 gibt einen Atmungsversuch mit Äthylalkohol wieder. Die erste Phase der Oxydation, die Dehydrierung des Alkohols zur Essigsäure wird durch Malonsäure kaum beeinflusst, die Oxydation der Essigsäure aber vollständig gehemmt. Dieses Ergebnis ist wichtig, weil es beweist, dass der Hemmstoff hier nicht ganz allgemein in den Wasserstofftransport—von den Dehydrasen zum Cytochrom—eingreift, wie Szent-Györgyi dies annahm (33), sondern selektiv nur den Abbau der Essigsäure (13) hemmt.

In Gegenwart der Malonsäure wird keine Kohlensäure mehr gebildet, Fumarsäure wirkt dieser Hemmung entgegen. Jetzt wird Essigsäure wieder oxydiert grösstenteils zu CO_2 , der Rest zu Synthesen verwendet. Die Annahme, dass Essigsäure mit Oxalessigsäure, die

TABELLE 2

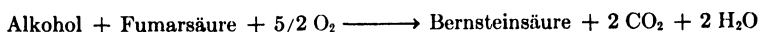
HEMMUNG DES ESSIGSÄUREABBAUS DURCH MALONSÄURE UND DIE WIRKUNG VON FUMARSÄURE (34)*

zugesetzt;		verbraucht;		gebildet;		
Fumarsäure	Alkohol	Fumarsäure	Essigsäure	Bernsteinsäure	CO_2	
—	1.02	—	0.82	0.02	0.04	
1.38	1.06	0.51	0.08	0.31	1.26	

* 1.2 gr. Bäckerhefe (verarmt) in 12 ml Wasser, die m/6-Äthanol und m/20-Malonsäure enthalten; 30° ; 6 Stunden unter O_2 geschüttelt. Mengen in mMol.

aus Fumarsäure stammt, die Kondensation eingeht und der weitere Abbau dieses Kondensationsproduktes über Oxalbernsteinsäure, α -Ketoglutarsäure, nachdem 2 Mol CO_2 in Freiheit gesetzt wurden, durch Malonsäure auf der Stufe der Bernsteinsäure festgehalten wird, ergibt die plausible Erklärung für die Annahme, dass gleichzeitig ein Teil der zugesetzten Fumarsäure verschwindet und dafür Bernsteinsäure auftritt.

Für diese Reaktionsfolge würde die Gleichung gelten:



Alkohol, Fumarsäure, Bernsteinsäure und Kohlendioxyd müssten demnach im Verhältnis 1:1:1:2 stehen, während 1.7:0.8:0.5:2 gefunden wurde. Der gegenüber CO₂ zu hohe Wert für Alkohol lässt erkennen, dass ein grosser Teil des Alkohols für synthetische Reaktionen verbraucht wurde (35,36). Im übrigen ist zu berücksichtigen, dass die Hemmung der Succino-Dehydrase durch Malonsäure in Gegenwart von Bernsteinsäure nie vollständig sein kann.

Dass die Bernsteinsäure auf oxydativem Wege über den Cyklus entstanden sein muss und nicht etwa durch Reduktion von Fumarsäure an der von Fischer und Mitarbeitern in der Hefe gefundenen Fumarathydrase (37,38), liess sich mittels deuterierter Essigsäure beweisen (39), denn beim Einsatz von D₃-Essigsäure und gewöhnlicher Fumarsäure entstand eine Bernsteinsäure, bei der ein Drittel der direkt an Kohlenstoff gebundenen Wasserstoffatome durch Deuterium ersetzt war (Tab. 3, ref. 39).

TABELLE 3

UMSATZ VON DEUTERO-ESSIGSÄURE UND FUMARSÄURE IN GEGENWART VON MALONSÄURE*

	Essigsäure		Fumarsäure		Bernstein-
	zugesezt:	verbraucht:	zugesezt:	verbraucht:	säure gefunden:
in mMol	30.5	29.6	51.7	31.9	20.2
Atom-% D im Anion	97.1	—	0	—	32.6

* 120 gr. Bäckerhefe in Wasser, das 2.8 gr. Malonsäure (27 mMol) enthält; Volumen 400 ml; 25°; Inkubationszeit: 8 Stunden.

Eine direkte Reduktion der Fumarsäure hätte zu leichter Bernsteinsäure führen müssen.

Über den Abbau der Essigsäure im Tierkörper

Es ist seit langem bekannt, dass Essigsäure nicht nur von einzelligen Organismen sondern auch in der Zelle der höheren Lebewesen oxydativ abgebaut wird. Elliott und Mitarbeiter (40-42) fanden in ihren systematischen Untersuchungen an Gewebsschnitten einen Acetatabbau in Niere, Leber, Hirn, und Hoden, in letzteren jedoch nur dann, wenn gleichzeitig Glucose zur Oxydation kam. Nach Liang (43) und Gorowitsch (44) hat auch die Lunge, nach Medes (45) und Mitarbeitern auch der Herzmuskel die Fähigkeit, Essigsäure zu oxydieren. Aber die Bedeutung der Essigsäure im intermediären Stoffwechsel

des Säugetiers liessen erst die Isotopenversuche von Bloch und Rittenberg (46) zu Tage treten. Sie verfütterten mit C^{13} markierte Essigsäure und berechneten aus dem Isotopengehalt der im Harn ausgeschiedenen Acetylverbindungen, dass im Säugetierorganismus pro 100 gr Körpergewicht täglich 0.9 bis 1.2 gr Essigsäure gebildet werden.

Was den Mechanismus des oxydativen Abbaus betrifft, so hatten schon Elliot und Greig (47) bei ihren Versuchen mit Leber und Niere geringe Mengen Bernsteinsäure nachgewiesen. Ausserdem lässt sich der Abbau durch Malonat hemmen, wie Wieland und Jennen (49) sowie Kleinzeller (48) an Niere beobachteten, was ebenfalls für eine Beteiligung von Bernsteinsäure und ihrer spezifischen Dehydrase spricht.

Dass der Abbau im Tierkörper tatsächlich den gleichen Weg einschlägt wie in der Hefe bewiesen Isotopenversuche von Buchanan, Sakami, Gurin und Wilson (51) wie auch von Weinhouse, Medes, Floyd und Noda (50). Sie bebrüteten Acetat, dessen Carboxylgruppe durch C^{13} markiert war mit Homogenisaten aus Meerschweincheniere und wiesen den isotonen Kohlenstoff in α -Ketoglutarat, Succinat und Fumarat nach.

Zur gleichen Zeit hatten Rittenberg und Bloch (52) analoge Versuche in vivo ausgeführt. Sie verfütterten an Ratten und Mäuse C^{13} -haltiges Acetat und isolierten aus dem Eiweiss, insbesondere jenem der Leber, markierte Asparagin- und Glutaminsäure. Da beide Aminosäuren mit Oxalessigsäure und α -Ketoglutarsäure im biologischen Gleichgewicht stehen war der Kohlenstoff aus dem verfütterten Acetat zweifellos über den Citronensäurecyklus dorthinein gelangt.

III. Der Mechanismus der Kondensationsreaktion

A. NACHWEIS EINER "AKTIVIERUNG" DER ESSIGSÄURE

Die Isotopenversuche von Sonderhoff und Thomas haben zweifellos bewiesen, dass beim biologischen Aufbau der Citronensäure die Gruppierung $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ der Essigsäure unverändert bleibt. Damit war ein wichtiger Anhaltspunkt für den Mechanismus dieser Reaktion gewonnen, indessen musste vorerst noch ganz offen bleiben, ob an der Kondensationsreaktion Essigsäure selbst oder ein Derivat davon teilnimmt. Es erübrigt sich, nochmals auf alle Argumente

einzugehen, die gegen einen Zusammenschluss von normalem Acetat mit Oxalacetat zu Citrat sprechen (vgl. Krebs, 20). Eines der stärksten war zweifellos die Beobachtung von Hallmann (53), dass ausgewaschener Muskelbrei Citronensäure zwar aus Oxalessigsäure und Brenztraubensäure bildet, die Synthese aber ausbleibt, wenn man Brenztraubensäure durch Essigsäure ersetzt.

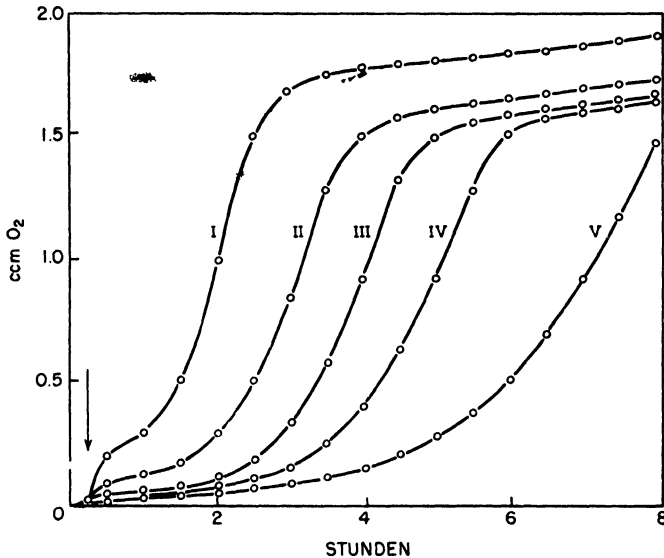


Abb. 2. Wirkung von Alkohol auf die Induktionsperiode beim Essigsäureabbau durch Hefe (26): (I) 368; (II) 184; (III) 92; (IV) 37; (V) ohne. (γ Alkohol/Ansatz.) 100 mg Hefe (17 Stdn. verarmt) in $m/30$ - KH_2PO_4 , 50 μ Mol Na-Acetat, 25°C. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Zugabe von Acetat und Alkohol.

Auch an Hefe lagen experimentelle Beobachtungen vor, wonach die Citronensäuresynthese einen komplizierteren Verlauf nimmt. So hatte man gefunden, dass weder lebende (54) noch eine durch Einfrieren plasmolysierte Hefe (22) anaerob Essigsäure mit Oxalessigsäure zu kondensieren vermochte. Aufschlussreicher waren Beobachtungen, wie sie bei Versuchen mit einer nach Wieland und Claren "verarmten" Hefe (55) gemacht wurden.

Wenn man Hefe vor dem Versuch durch längeres Schütteln unter O_2 ihrer Inhaltsstoffe beraubt, so kommt die Reaktion mit Acetat

erst nach mehrstündiger Induktionszeit in Gang, während die Hefe, so wie sie aus der Brauerei oder Hefefabrik kommt, den Process sofort anlaufen lässt. Diese Induktionszeit lässt sich, wie Wieland und Probst fanden (56), durch geringe Mengen Äthylalkohol aufheben oder doch erheblich verkürzen (Abb. 2). Auch andere Substanzen zeigen diesen Effekt, sofern die Hefe nur in der Lage ist, sie zu oxydieren. So kürzen ausser Äthanol auch Acetaldehyd, Glucose, Milchsäure, Brenztraubensäure, Bernsteinsäure, Bernsteinsäurehalbaldehyd und, was wichtig ist, auch Propanol und Butanol sowie die entsprechenden Aldehyde die Induktionszeit ab (26). Da die höheren Alkohole durch Hefe im wesentlichen nur bis zu den entsprechenden Säuren oxydiert werden—Buttersäure bleibt ganz liegen, während Propionsäure nur sehr langsam abgebaut wird (57)—musste demnach auch die Wirkung von Äthylalkohol und Acetaldehyd mit ihrer Oxydation zu Essigsäure im Zusammenhang stehen.

Diese Wirkung ist eine zweifache. Einmal betrifft sie den Vorgang, der die für den Ablauf des Kreisprocesses notwendige Oxalessigsäure bereitstellt, zum zweiten deren Kondensation mit Essigsäure. Bei der ersten Reaktion handelt es sich nach Lynen um die Wood-Werkman Reaktion, die Carboxylierung von Brenztraubensäure, die aus den auch in verarmter Hefe noch vorhandenen geringen Kohlenhydratreserven geliefert wird. Die für diese Carboxylierung nötige Energie (58) muss von einem Oxydationsvorgang geliefert werden; wie wir auf Grund der Arbeiten von Ochoa wissen, ist es wahrscheinlich der bei der Dehydrierung von Alkohol bzw. Aldehyd verfügbar werdende Wasserstoff geeigneten Potentials, der sie zur Verfügung stellt (58).

Um den zweiten Effekt zu erklären—die Wirkung auf die Kondensationsreaktion—entwickelte Lynen (26) die Vorstellung, dass die Kondensation von Essigsäure mit Oxalessigsäure nur dann zustande kommt, wenn gleichzeitig ein Aldehyd zur Säure oxydiert wird. Es ist demnach nötig bei "verarmter" Hefe, die ja kaum noch atmet, durch Zugabe eines oxydierbaren Aldehyds oder seiner Vorstufe den Acetatabbau in Gang zu setzen, ihn gewissermassen zu "entzünden." Ist aber die Reaktion einmal angelaufen, dann schafft die im Cyklus erfolgende Verbrennung der Essigsäure selbst die Voraussetzung für die Kondensation und damit für eine vollständige Oxydation der zugesetzten Säure. Diese verbrennt also gewissermassen "in ihrem eigenen Feuer." Nach neueren Versuchen kann nicht nur die Oxydation eines Aldehyds zur Säure diese Aktivierung bewirken, sondern auch

andere Oxydationsvorgänge; Alkohol ist daher in äquivalenter Menge wirksamer als Aldehyd.

Nach Lynen sind Oxydationsvorgang und Kondensationsreaktion über stöchiometrische, chemische Reaktionen miteinander gekoppelt, der Art, dass durch den Oxydationsvorgang entweder Essigsäure oder Oxalessigsäure chemisch substituiert werden und erst diese dadurch "aktivierten" Molekeln dann die Aldolkondensation zur Citronensäure oder, wie damals angenommen wurde, zu einer "Vorstufe" eingehen. Welcher der beiden Partner aktiviert wird liess sich auf Grund der Experimente Lynens nicht entscheiden. Es lag aber nahe, an die Essigsäure zu denken, denn es musste ja der Zweck dieser Aktivierung sein, die Wasserstoffatome der Methylgruppe reaktionsfähiger und der Kondensation zugänglicher zu machen.

B. NACHWEIS EINES "AKTIVEN" 2C-FRAGMENTES BEIM PYRUVATABBAU IN TIERISCHEM GEWEBE

Versuche mit ganz anderem Material, Herzmuskel und Pyruvat statt Hefe und Essigsäure, führten Martius zu einer ähnlichen Auffassung. Nachdem die Reindarstellung und optische Spaltung der Oxalacitralsäure gelungen war, jenes Stoffes, der in vitro aus Oxalessigsäure und Brenztraubensäure so leicht entsteht (3), konnte die Frage experimentell geprüft werden, ob diese Säure als Zwischenprodukt bei der Synthese in der Zelle anzunehmen war. Das Resultat war eindeutig: Weder Herzmuskel noch Leber oder Niere waren imstande, die Ketosäure zu Citronensäure abzubauen (59).

Wenn daher Muskelbrei aus Pyruvat und Oxalacetat Citronensäure bildet (20,53), so musste eine Oxydation und nicht eine Kondensation die erste Stufe der Reaktionsfolge sein. Dies ging weiterhin aus Hemmungsversuchen mit zwei Stoffen von ganz verschiedenem Wirkungsmechanismus, α -Ketobuttersäure und Acetaldehyd, hervor. Die Wirkung der α -Ketobuttersäure beruht auf der kompetitiven Hemmung an der Brenztraubensäure-Dehydrase, die wie Long und Peters (60) gefunden hatten, auch die α -Ketobuttersäure angreift, wobei die Oxydation auf der Stufe der Propionsäure halt macht. Während hierbei also die Nachlieferung des zur Kondensation mit Oxalessigsäure nötigen 2C-Körpers direkt gehemmt wird, beruht die Wirkung des Acetaldehyds darauf, dass dieser mit der Oxalessigsäure in Konkurrenz tritt indem er seinerseits ebenfalls mit dem 2C-Körper reagiert. Für jedes weniger gebildete Molekül Citronensäure tritt

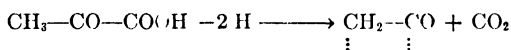
dafür ein Molekül Acetoin auf, dessen Entstehung aus primär gebildetem Diacetyl durch Reduktion erklärt werden muss (59). Für das bei der Dehydrierung der Brenztraubensäure entstehende, offenbar sehr reaktionsfähige Produkt wurde die Struktur eines auf der Oxydationstufe der Essigsäure stehenden, in seinem Verhalten Ketten-ähnlichen Körpers in Betracht gezogen (59) (Mit der Formel $\text{CH}_2\text{--CO}$ sollte weniger die Struktur des Zwischenproduktes als

$$\begin{array}{c} \vdots \\ \vdots \end{array}$$

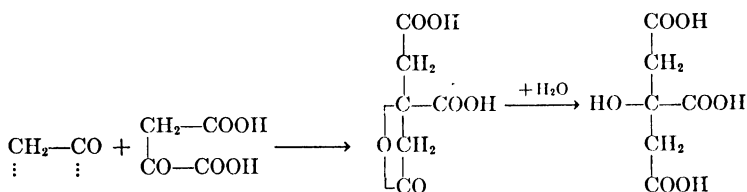
vielmehr seine besondere Reaktionsweise bezeichnet werden). Das folgende Schema sollte die verschiedenen Möglichkeiten der Weiterreaktion andeuten.

Reaktionsweise des "aktiven" 2C-Fragmentes aus Pyruvat (nach 59)

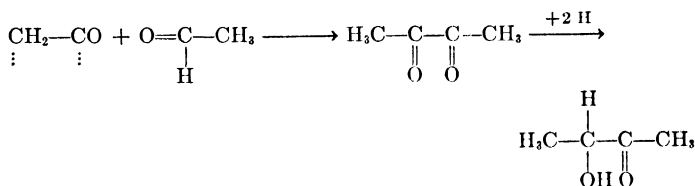
(1) Dehydrierung von Brenztraubensäure:



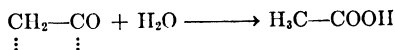
(2a) Bildung von Citronensäure:



(2b) Bildung von Diacetyl-Acetoin:



(3) Bildung von Essigsäure:



Weiterhin Acetylierung von Aminen usw.

Oxydative Decarboxylierung der Brenztraubensäure und Bildung von Essigsäure neben vollständiger Verbrennung zu CO_2 und H_2O waren schon von Long und Peters bei ihren Arbeiten mit Taubenhirnbrei aufgezeigt worden (60,61).

Durch die Beobachtung, dass der mit Oxalessigsäure Citronensäure bildende aktive 2C-Körper mit Acetaldehyd Diacetyl-Acetoin liefert, ist auch das Problem der Carboligase wieder neu aufgerollt worden. Man hat bisher meist angenommen (62), dass nur carboxylatisch gebildeter "nascierender" Acetaldehyd zur Acetoin-Bildung befähigt sei. Bei der angeführten Konkurrenzreaktion zwischen Oxalessigsäure und Acetaldehyd handelt es sich aber wohl mit Sicherheit um einen auf der Stufe der Essigsäure stehenden Körper, der wie wir heute wissen, auch direkt aus Essigsäure gebildet werden kann (vgl. S. 190). Damit ist aber die Möglichkeit aufgezeigt, wie sich Acetoin auch ohne Brenztraubensäure bilden kann, etwa auf dem Wege: Acetaldehyd \rightarrow Essigsäure \rightarrow "aktivierte" Essigsäure (+ Acetaldehyd) $\xrightarrow{+2H}$ Acetoin. Frühere Angaben, wonach Acetoin direkt aus Acetaldehyd entstehen soll (63), gewinnen damit wieder an Wahrscheinlichkeit. Da nach der neusten Auffassung die "aktivierte" Essigsäure ein Phosphorsäurederivat sein soll, verdienen Beobachtungen von Silverman und Werkman Interesse (64), die gefunden hatten, dass *Aerobacter aerogenes* nur bei Gegenwart von anorganischem Phosphat Acetoin bildet, und das intermediäre Auftreten eines phosphorylierten Körpers postuliert hatten.

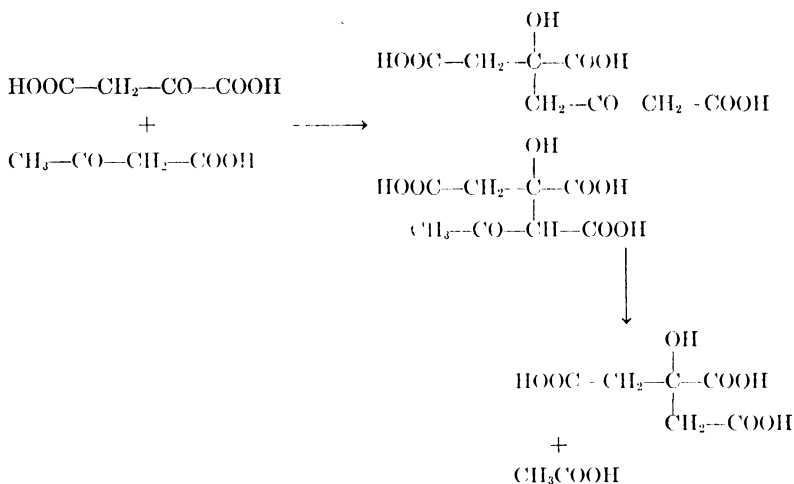
C. CITRONENSÄUREBILDUNG AUS ACETESSIGSÄURE UND ANDEREN β -KETOSÄUREN

Unabhängig von einander entdeckten Breusch (65,66) sowie Wieland und Rosenthal (67), dass Niere, Gehirn, Herz und Skelettmuskel aus Oxalessigsäure und Acetessigsäure Citronensäure bilden und dass auch andere β -Ketosäuren in diese Reaktion eintreten können (68). Insbesondere wenn sein Abbau durch Barium- oder Magnesiumsalze unterbunden war, liessen sich grosse Mengen Citrat, bis zu 80% des eingesetzten Acetacetates, aus dem Reaktionsgemisch isolieren.

Waren die hohen Citratausbeuten an sich schon von kaum abzuleugnender Beweiskraft für die Herkunft der Säure, so erbrachte den unwiderlegbaren Beweis dafür auch hier wieder der Isotopenversuch. Weinhouse, Medes und Floyd (69) wiederholten die Experimente von Wieland und Rosenthal an Niere unter Einsatz einer in Carboxyl- und Carbonylgruppe durch C^{13} markierten Acetessigsäure und konnten in den primären Carboxylgruppen des gebildeten Citrates grosse Mengen C^{13} nachweisen. Wie die Berechnung der Isotopenverdünnung ergab, waren 70% der Citronensäure aus Acetessigsäure entstanden.

Vorher hatten schon Buchanan, Sakami, Gurin und Wilson (51) über ähnliche Versuche berichtet; sie isolierten dabei α -Ketoglutar säure und fanden C¹³ ausschliesslich in der zum Carbonyl entfernt stehenden Carboxylgruppe.

Die zunächst geäusserte Vermutung (66,67), dass ein enzymatisch gebildetes Kondensationsprodukt aus Oxalessigsäure und Acetessigsäure die Vorstufe der Citronensäure bildet, wurde den experimentellen Befunden von Wieland und Rosenthal nicht gerecht.



Insbesondere fanden die beiden Autoren kaum Essigsäure, dafür aber mehr Citronensäure als man auf Grund dieses Reaktionsschemas erwarten durfte. Sie schlossen daraus, dass die Acetessigsäure im Gewebe nicht nur mit einer Molekel Oxalessigsäure sondern mit zwei in Reaktion tritt (67), wie es dann später auch durch die analytischen Bestimmungen von Hunter und Leloir einwandfrei belegt wurde (70).

Die Annahme eines Primärproduktes jedoch, in dem sich die Acetessigsäure zweifach mit der Oxalessigsäure kondensiert hat (67), erscheint wenig befriedigend und wird von Wieland selbst abgelehnt (12,67). Will man daher an einer Kondensation zwischen Acetessigsäure und Oxalessigsäure als erstem Schritt der Synthese festhalten, dann bleibt nur die Annahme übrig, dass die bei der anschliessenden Hydrolyse frei werdende Essigsäure sich über Acetessigsäure von neuem mit Oxalessigsäure vereinigt (66,67).

Isotopenexperimente von Buchanan, Sakami, und Gurin (71), die

an sich zu einem ganz anderen Zweck ausgeführt wurden, widerlegen jedoch diese Hypothese. Denn in diesem Fall müsste während der Oxydation einer Acetessigsäure, die nur in der Carbonyl- oder nur der Carboxylgruppe C^{13} enthält—je nach Struktur des Kondensationsproduktes—allmählich in beiden Gruppen C^{13} erscheinen. Buchanan und Mitarbeiter fanden das Gegenteil.

Man nimmt daher heute allgemein an, dass eine Spaltung von Acetessigsäure in "aktivierte" Essigsäure die Reaktion einleitet (12,51,59, 69,70,73) und sich dann die Kondensation in bekannter Weise anschliesst. Dadurch wird es nicht nur verständlich, dass die Acetessigsäure sich zweifach, nämlich mit zwei Mol "aktivierter" Essigsäure an dieser Synthese beteiligt, sondern man sieht dann auch ein, warum die Synthese nur in gekoppelter Reaktion mit einem Oxydationsvorgang erfolgen kann.

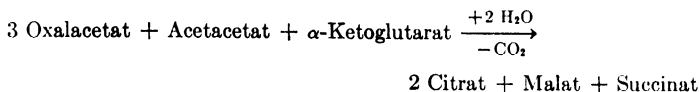
Bereits Wieland und Rosenthal (67) wiesen nachdrücklich darauf hin, dass in den Versuchen mit Niere nur in Gegenwart von Sauerstoff Citrat gebildet wird. Unter Stickstoff findet praktisch keine Synthese statt und auch die Sauerstoffkonzentration der Luft lässt weniger Citronensäure entstehen als reiner Sauerstoff.

TABELLE 4

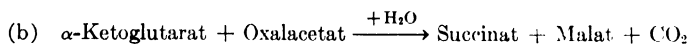
CITRONENSÄURESYNTHESE AUS ACETESSIGSÄURE UND OXALESSIGSÄURE (67)
40 g. Nierenbrei (Rind), 100 cm 0.8% NaCl-Lösg., 2 mMol $BaCl_2$, 1 mMol Acetacetat, 2 mMol Oxalacetat; 37°; 35 Minuten geschüttelt

im Gasraum	mg Citronensäure gebildet
O ₂	170
Luft.....	97
N ₂	4

Hunter und Leloir (70) haben sich unter Verwendung ausgewaschener Nierenhomogenisate mit dieser gekoppelten Reaktion beschäftigt und dabei gefunden, dass die Citronensäuresynthese nur dann zustande kommt, wenn gleichzeitig eine Dehydrierung von Glutaminsäure oder α -Ketoglutarsäure nebenherläuft. Die Dehydrierung der α -Ketoglutarsäure kann aerob auf Kosten des Sauerstoffs erfolgen, aber auch anaerob, wenn überschüssige Oxalessigsäure den verfügbar werdenden Wasserstoff aufnimmt. Hunter und Leloir fanden für die anaerobe Reaktion folgende Gleichung:



die entstanden ist aus den beiden gekoppelten Gleichungen:



Wie Hunter und Leloir annahmen, ist es die Aufgabe des Oxydationsvorganges, in gekoppelter Reaktion "aktivierte" Essigsäure zu bilden, welche dann von selbst mit Oxalessigsäure die Kondensation zu Citronensäure eingeht.

Damit ist aber die Synthese aus Acetessigsäure auf den gleichen Mechanismus zurückgeführt wie jene aus Acetat oder Pyruvat und der einzige Unterschied zu diesen besteht nur in der Reaktion, durch welche der eigentliche Reaktionspartner, "aktivierte" Essigsäure, entsteht.

Beim Übergang von Acetacetat in den reaktiven 2C-Körper tritt Essigsäure selbst als Zwischenprodukt nicht auf. Dies geht schon daraus hervor, dass Acetessigsäure von Nierenhomogenat bedeutend schneller umgesetzt wird als Acetat, vor allem aber aus Experimenten mit isotopt-markierter Acetessigsäure. Denn beim Bebrüten dieser Säure mit gewöhnlichem Acetat und α -Ketoglutarat unter Sauerstoff trat in die Ketosäure wesentlich mehr C^{13} über als in Essigsäure (74).

Die Reaktion kommt also nicht in der Weise zustande, dass zunächst eine Spaltung der Acetessigsäure in zwei Moleküle Essigsäure erfolgt, die dann in gekoppelter Reaktion "aktiviert" werden. Wenn daher in der Zelle aus Acetacetat freie Essigsäure entsteht, wie es Lehninger (75) beobachtet hat, dann dürfte es sich hier um eine Stabilisierung der primär entstehenden "aktivierten" Essigsäure handeln, wie sie ja auch bei der Oxydation von Pyruvat auftritt, wenn Oxalacetat fehlt.

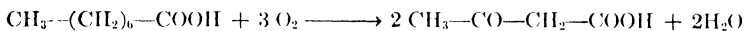
Immerhin waren diese Versuche Lehningers ein Hinweis darauf, dass in der Zelle die C_4 -Kette der Acetessigsäure in zwei Acetyl-Bruchstücke aufgespalten wird. Das Gleiche gilt für Versuche Lipmanns (76), in welchen die Acetylierung von Sulfonamid mittels atmender Homogenisate von Taubenleber studiert wurde. Lipmann fand, dass in diesem System Essigsäure als Quelle der Acetylgruppe durch Acetessigsäure ersetzt werden kann.

Im übrigen ist die Spaltung der Acetessigsäure zur Stufe der Essigsäure nichts anderes als die Umkehr einer schon lange bekannten Reaktion, der Synthese von Acetacetat aus Essigsäure (77,78). Wie neue Versuche ergeben haben, läuft diese Synthese ebenfalls über "aktivierte" Essigsäure.

D. DIE OXYDATION DER FETTSÄUREN

Eine wichtige Etappe auf dem Wege zur Aufklärung der biologischen Oxydation der Fette war die Entdeckung von Muñoz und Leloir (79), dass nicht nur Leberschnitte, mit denen man bis dahin bevorzugt experimentiert hatte, sondern auch Leberbrei, ja sogar ein ausgewaschenes Homogenisat aus Leber noch in der Lage ist, gesättigte Fettsäuren wie Butter-, Valerian-, Önanth-, und Caprylsäure oxydativ abzubauen (80,81). Bot sich doch damit die Möglichkeit, die Komponenten dieses Oxydationssystems zu studieren. Es stellte sich dabei heraus, dass dem Reaktionsgemisch ausser anorganischem Phosphat, Magnesium- oder Mangansalzen, Adenosinmonophosphat und Cytochrom c auch noch Fumarat zuzusetzen war. Konnte man so zwar schon vermuten, dass auch hier der Citronensäurecyclus beteiligt ist, so erbrachten den definitiven Beweis dafür erst Arbeiten Lehningers.

Lehninger (82-84) hat in einer Reihe schöner Arbeiten dieses Enzymsystem eingehend studiert, hauptsächlich unter Verwendung von Caprylsäure als Substrat. Wie er entdeckte, schlägt die Oxydation der Säure in Gegenwart von Malonat verschiedene Wege ein, je nachdem ob Fumarat zugegen ist oder nicht. Ohne Zusatz geht Caprylsäure quantitativ in Acetessigsäure über nach der Gleichung:



In Gegenwart stöchiometrischer Mengen Fumarat dagegen wird weniger Acetacetat gebildet; dafür entstehen nunmehr unter Verbrauch von Fumarat Citronensäure und ihre Umsetzungsprodukte. Der Umsatz des Caprylsäure wird aber durch den Zusatz nicht beeinflusst (Tab. 5).

Wie Lehninger weiterhin fand, verhält sich Brenztraubensäure im Enzymsystem des Leberpräparates wie die Fettsäure. Auch hier führt die Oxydation in Abwesenheit von Fumarsäure ausschliesslich zu Acetessigsäure, mit Fumarsäure dagegen teilweise wieder zu den

TABELLE 5

 UMSATZ VON CAPRYLSÄURE DURCH LEBERENZYM IN GEGENWART
 VON MALONAT (84)

2.5 ml Leberenzym, 0.8 ml MgSO₄ (0.005 m), 0.8 ml Phosphatpuffer (0.008 m), 0.8 ml Malonat (0.01 m), 0.8 ml ATP (0.0019 m) und 1.4 ml Wasser; ausserdem 0.4 ml Caprylat (0.001 m) und 0.6 ml Fumarat (0.009 m) bzw. 0.6 ml Wasser; 31°; 34 Minuten aerob geschüttelt. Mengenangaben in C-Äquivalenten (1 μ Atom C = 22.4 μl).

	ohne Fumarat	mit Fumarat
Caprylsäure verbraucht.....	1056	1056
gefunden:		
Acetessigsäure.....	980	528
Citronens. + Isocitronens. + Aconits....	16	185
α-Ketoglutarsäure + Bernsteinsäure..	10	216

Säuren des Citronensäurecyklus (84).



Da aber das Präparat unter den gleichen Bedingungen aus zugesetztem Acetacetat und Oxalacetat kein Citrat bildet, kann die Ketosäure kein Zwischenprodukt der Synthese sein. Somit bleibt nur die Annahme übrig, dass die Oxydation sowohl bei der gesättigten Fettsäure wie auch bei der Brenztraubensäure zunächst zu einem reaktionsfähigen 2C-Körper führt, der sich mit Oxalacetat zu Citronensäure kondensieren kann, in Abwesenheit dieses Partners aber mit sich selbst reagiert und dabei Acetessigsäure liefert (84).

Dass Acetessigsäure aus der bei der β-Oxydation der Fettsäuren abgespaltenen Acetylgruppe aufgebaut wird, hatten auch schon Isotopenexperimente von Weinhouse, Medes und Floyd (85) nahegelegt. Sie fanden nach Bebrütung von Caprylsäure, deren Carboxylgruppe durch C¹³ markiert war, mit Leberschnitten unter Sauerstoff eine Acetessigsäure, die sowohl in der Carboxylgruppe wie in der Carbonylgruppe C¹³ enthielt. Dies ist aber nur zu erklären, wenn Acetessigsäure nicht direkt aus Caprylsäure entsteht sondern die Fettsäure zunächst oxydativ in 2C-Fragmente aufgespalten wird, die sich dann anschliessend wieder zu Acetessigsäure kondensieren. Buchanan, Sakami und Gurin (71) konnten die Versuche von Weinhouse und Mitarbeitern bestätigen und ergänzen. Im übrigen verhält sich Buttersäure wie die Caprylsäure (86).

Auch von der Essigsäure aus kommt man zur Acetessigsäure, wie schon Embden und Loeb (77) in Durchströmungsversuchen an Leber entdeckt hatten und neuerdings mit Hilfe der Isotopenmethode an atmenden Gewebsschnitten bestätigt werden konnte. Insbesondere in Leber (87) und Niere (45) wird ein grosser Teil der zugesetzten Essigsäure über Acetessigsäure verbrannt, so dass verschiedentlich in der Ketosäure ein obligates Zwischenprodukt des Acetatabbaus gesehen wurde (67,87). Diese Vorstellung ist aber falsch. Denn eine genaue Analyse der Isotopenverteilung liess erkennen, dass auch in der Niere nur die Hälfte des Acetates über Acetessigsäure verbrannt worden war, der Rest jedoch auf einem direkten Weg (45). Im Gegensatz zu Leber und Niere entsteht beim enzymatischen Essigsäureabbau durch Herzmuskel keine Spur der Ketosäure. Medes und Mitarbeiter (45) ziehen aus ihren Versuchen den Schluss, dass im Gewebe aus Essigsäure zunächst eine "aktivierte" Essigsäure gebildet wird, die dann in den Citronensäurecyklus eingehen kann, in Leber und Niere aber infolge eines Mangels an Oxalessigsäure zu Acetessigsäure zusammentritt. Sekundär kann dann die Acetessigsäure wieder zu "aktivierter" Essigsäure aufgespalten werden. Die Ketosäure liegt somit nur in einem Seitenweg des Acetatabbaus.

Da die Bildung von Acetessigsäure aus Essigsäure wie auch ihre Oxydation im Citronensäurecyklus über die "aktivierte" Essigsäure erfolgt, ist es verständlich, dass die Synthese nur zustande kommt, wenn Oxydationsenergie verfügbar ist (87). Arbeitet man daher mit ausgewaschenen Gewebshomogenisaten, dann muss ausser Acetat noch eine leicht oxydierbare Substanz wie Pyruvat (88) oder eine Säure des Cyklus zugesetzt werden (89,90).

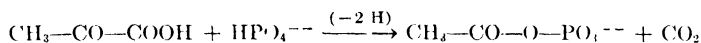
Die beiden synthetischen Reaktionen, die einerseits zu Acetessigsäure andererseits zu Citronensäure führen, sind demnach miteinander verwandt, denn bei beiden ist die gleiche "aktivierte" Essigsäure beteiligt. Es ist daher zu erwarten, dass Erfahrungen, die man beim Studium des einen Vorganges gemacht hat, auf den anderen übertragen werden können und umgekehrt. Diese Vermutung hat sich bei Untersuchungen aus jüngster Zeit, welche die chemische Struktur der "aktivierten" Essigsäure klarstellen könnten, glänzend bewahrt (128,143).

E. DIE NATUR DER "AKTIVIERTEN" ESSIGSÄURE

Das Problem des bei der Citronensäuresynthese intermediär auftretenden 2C-Körpers ist lange Zeit rätselhaft gewesen und scheint

erst in allerletzter Zeit einer endgültigen Lösung nähergerückt zu sein. Alle z.Z. für die "aktivierte" Essigsäure diskutierten Formeln stimmen darin überein, dass es sich um eine Verbindung der Phosphorsäure und der Essigsäure bzw. eines auf gleicher Oxydationsstufe stehenden 2C-Körpers mit hohem Energieinhalt handeln muss.

Schon frühere noch nicht im Hinblick auf den Citronensäurecyklus gemachte Arbeiten hatten die Notwendigkeit der Phosphorsäure beim Umsatz der Brenztraubensäure ergeben. So hatte Lipmann an *Lactobacillus Delbrückii* gefunden, dass die Dehydrierung der Brenztraubensäure nicht vom Hydrat ausgeht, wie bisher die Annahme war, sondern von einem Addukt der Phosphorsäure und zu Acetylphosphorsäure führt (91-93).



Fehlt anorganisches Phosphat, dann findet überhaupt keine Dehydrierung der Ketosäure statt. Tierische Gewebe wie Gehirn (97), Niere (94,97), Leber (94) oder Muskel (95,96) verhalten sich ganz analog, jedoch ist hier ausser Phosphat auch noch Mg^{++} und Adenosinphosphat zuzusetzen, die niedermolekularen Komponenten enzymatischer Transphosphorylierungssysteme. Ihre Wirkung ist eine doppelte, wie sich an einer Aktivierung des Pyruvatumsatzes einerseits, andererseits aber an einer weit darüber hinausgehenden Steigerung der Atmung zu erkennen gibt. Während ohne das Coferment die Oxydation im wesentlichen nur bis zur Stufe der Essigsäure führt und somit pro Mol umgesetzter Brenztraubensäure etwa $\frac{1}{2}$ Mol Sauerstoff verbraucht werden, steigt nach Zugabe der Adenylsäure der Sauerstoffverbrauch auf das Doppelte, ja sogar noch höher an und weist damit auf eine über die Stufe der Essigsäure hinausgehende Oxydation hin (97,101).

Das Adenosinphosphat nimmt dabei die Energie des Oxydationsvorganges zu einem grossen Teil auf (94,95). Wie Ochoa fand (96), werden für jede oxydierte Molekel Pyruvat etwa 15 Molekeln Adenosintriphosphat aus dem Diphosphat synthetisiert.

Beim Abbau von Essigsäure tritt die Phosphorylierung ebenfalls in Erscheinung, wie zuerst an Hefe (98) später auch an Leber und Niere beobachtet wurde, und das Gleiche gilt für den Abbau der höheren Fettsäuren (100,144). Diese Beobachtungen und die Erkenntnis, dass Dissimilation und Synthese in der belebten Natur ganz allgemein über die energiereichen Bindungen der Adenosinphosphate miteinander verknüpft sind, führen fast zwangsläufig dazu,

die Funktion der mit der Synthese von Citronensäure aus Oxalessigsäure und Essig- oder Acetessigsäure gekoppelten Oxydationsvorgänge in der Bereitstellung von Adenosintriphosphat zu suchen (siehe auch 103-105). Sowohl bei der aeroben Dehydrierung von Alkohol oder Acetaldehyd durch Hefe (98,99) wie auch bei der Dismutation zwischen α -Ketoglutaräure und Oxalessigsäure im Nierenhomogenisat (106) liess sich eine Phosphorylierung nachweisen. Als beweisend für diese Auffassung dürfen Versuche von Stern und Ochoa angesehen werden, in welchen die Bildung von Citronensäure aus Essigsäure und Oxalessigsäure beobachtet werden konnte, wenn zu den Versuchsansätzen ausser einer Proteinfraction aus getrockneter Taubenleber und einer Lösung des "Coenzym A" noch A.T.P. hinzugefügt wurde (128). Auf die Bedeutung des Coenzym A für die Synthese der Citronensäure sei hier nur kurz hingewiesen.

Zusammenfassend ergibt sich: Während die Dehydrierung der Brenztraubensäure unter Aufnahme anorganischen Phosphates direkt zur phosphorylierten Verbindung führt, muss dieses Zwischenprodukt aus Essigsäure und Acetessigsäure in einer anaeroben Reaktion mit Adenosintriphosphat gebildet werden.

Es war naheliegend, in dem Zwischenprodukt jenes Acetylphosphat zu vermuten, welches nach Lipmann bei der Pyruvatdehydrierung durch Milchsäurebakterien entsteht. Aber die reine Verbindung, von Lynen zu diesem Zwecke erstmals als kristallisiertes Silbersalz synthetisch hergestellt (107), enttäuschte. Weder plasmolysierte Hefe, noch Herzmuskelbrei oder Nierenhomogenisat vermochten zusammen mit Oxalessigsäure aus ihr Citronensäure zu synthetisieren (30,59,70).*

IV. Aconitase

A. EINLEITUNG

Unter den Teilreaktionen des Citronensäurecyklus verdient die von dem Enzym Aconitase bewirkte reversible Umwandlung Citronensäure \rightleftharpoons *cis*-Aconitsäure \rightleftharpoons Isocitronensäure aus zwei Gründen besondere Beachtung. Erstens weil die Frage: Citronensäure- oder Tricarbonsäurecyklus? d.h. die Frage nach dem Primärprodukt der Reaktion zwischen Oxalessigsäure und dem "aktiven" 2C-Körper aufs engste mit dem Aconitaseproblem verknüpft ist. Zweitens weil die Kinetik dieses Processes Besonderheiten aufweist, die damit zusammenhängen, dass es sich dabei um das einzige bisher bekannte Beispiel eines enzymatisch gekoppelten Dreikörpersystemes handelt.

* Siehe Nachtrag bei der Korrektur, S. 221.

Die erste Beobachtung über die Bedeutung der *cis*-Aconitsäure und ihrer Hydratisierung beim Abbau der Citronensäure wurde von Martius (14) gemacht, der nachweisen konnte, dass im Gegensatz zur stets als inaktiv befundenen *trans*-Form der Säure die *cis*-Aconitsäure im Thunbergversuch die Citronensäure ebenso ersetzen kann wie Isocitronensäure und dass sie sich auf enzymatischem Wege in Citronensäure überführen lässt. Der Nachweis eines besonderen, von der bekannten Fumarase verschiedenen Enzymes wurde unabhängig voneinander von Martius (108) und von Jacobsohn (109) erbracht, der Name Aconitase von Breusch (110) für dieses Ferment vorgeschlagen. Die von Jacobsohn aufgestellte Hypothese (109,111), dass die Aconitase aus zwei Teilenzymen bestehe, von denen das eine die Reaktion *cis*-Aconitsäure \rightleftharpoons Citronensäure, das andere die Reaktion *cis*-Aconitsäure \rightleftharpoons Isocitronensäure katalysieren solle, hat sich als falsch erwiesen (112). Insbesondere sprechen auch die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen eindeutig gegen eine solche Auffassung.

B. VORKOMMEN, EIGENSCHAFTEN UND BEEINFLUSSUNG DES FERMENTES

Entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu dem Fermentsystem des Citronensäurecyklus gehört die Aconitase zu den ubiquitär vorkommenden Fermenten. Sie wurde bisher in allen daraufhin untersuchten Materialien, Bakterien, Hefe, pflanzlichen und tierischen Geweben gefunden (108,109). Vergleichende systematische Untersuchungen über den Aconitasegehalt biologischer Objekte liegen bisher noch nicht vor. In tierischem Gewebe geht der Gehalt an Aconitase im allgemeinen der Grösse des aeroben Stoffwechsels parallel; Leber, Herz, Niere, Taubenbrustmuskel sind besonders reich an dem Enzym.

Über die chemische Natur der Aconitase, die zu den Lyoenzymen rechnet, ist wenig bekannt, was damit zusammenhängt, dass die Darstellung hochgereinigter oder kristallisierter Präparate noch nicht gelungen ist, offenbar weil mit zunehmender Reinigung die Stabilität des Enzymes stark abnimmt. Zu 23-fach angereicherten Präparaten gelangten kürzlich Buchanan und Anfinsen (114) durch Alkohol- und Ammonsulfatfällung bei niedrigerer Temperatur. Die erhaltenen Präparate mit einem Reinheitsgrad von maximal 30% enthielten noch Hämoprotein, Isocitrico-Dehydrase und wenig Fumarase als nachgewiesene Verunreinigungen.

Begleitende Proteine üben einen schützenden Einfluss auf das Fer-

ment aus, in gleicher Weise wirkt Glycerin und vor allem auch die Substrate (114). Der Aconitasegehalt wässriger Muskelextrakte nimmt daher schnell ab, während Glycerinauszüge haltbarer sind (113) und eiweissreiche Leberextrakte bei 0° lange ihre Aktivität bewahren (108).

Über die Abtrennung oder den Nachweis einer Wirkgruppe oder eines Aktivators organischer oder anorganischer Natur ist bisher noch nichts bekannt geworden. Da durch nicht zu lange ausgedehnte Dialyse eine Abnahme der enzymatischen Aktivität nicht bewirkt wird, liegt eine leicht abdissozierende Wirkgruppe jedenfalls wohl nicht vor. Der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Aktivität der Aconitase ist von Krebs untersucht worden (113). Als stark hemmend erwiesen sich: Cu^{++} , HgCl_2 , HCN , H_2S ; bei gereinigten Enzympräparaten auch Cystein (Buchanan und Anfinsen, 114). Diese Befunde wären vielleicht mit der Annahme von SH-Gruppen als für die Wirkung des Fermentes wesentlichen Bestandteilen gut vereinbar. Eine von Jacobsohn (109) angegebene starke Hemmung durch NaF wurde nicht wieder beobachtet (113). Leider konnte bisher kein einziges Enzymgift aufgefunden werden, welches spezifisch nur die Aconitase hemmt, ohne die an der Synthese der Citronensäure beteiligten Fermente zu schädigen, so dass es nicht möglich war, auf diese Weise die Frage nach dem Primärprodukt des Citronensäurezyklus zu lösen.

C. SUBSTRATE UND KINETIK DER ACONITASE

Wie schon einleitend erwähnt stellt die Aconitase insofern eine Besonderheit dar, als sie als einziges bisher bekanntes Enzym auf drei chemisch verschiedene Substrate eingestellt ist, welche sie in einander bis zu einem Gleichgewichtszustand zu überführen vermag.

Von diesen war dank ihres Vorkommens in vielen Pflanzen die *Citronensäure* am längsten und besten bekannt; ihre Anwesenheit in tierischen Gewebsflüssigkeiten entdeckt und systematisch untersucht zu haben ist das Verdienst Thunbergs und seiner Schule.

Von den vier möglichen stereoisomeren Formen der *Isocitronensäure* besitzt nur die linksdrehende Form der normalen Isocitronensäure physiologische Bedeutung. Sie wurde erstmals von Nelson (115,116) im Saft der Brombeere aufgefunden. Synthetische Präparate der racemischen Säure unterscheiden sich insofern, als das aus Chloral und Bernsteinäure über Trichlormethylparaconsäure hergestellte Produkt (117) reine racemische Isocitronensäure darstellt, während man durch Reduktion von Oxalbernsteinsäureester mittels Pt-H_2 , Raneynickel

oder Aluminiumamalgam stets wechselnde Gemische von rac. Isocitronensäure und der unphysiologischen Allo-Säure erhält. Eine optische Spaltung der Racemate bereitet Schwierigkeiten und ist bisher noch nicht befriedigend gelungen.

Analytisch lässt sich (-)-Isocitronensäure am einfachsten polarimetrisch bestimmen, da sie mit Molybdat einen Komplex mit hoher spezifischer Drehung bildet (108). Doch muss berücksichtigt werden, dass die spez. Drehung des Komplexes in hohem Masse abhängig ist von der Konzentration und von gleichzeitig anwesenden anderen Säuren insbesondere Citronensäure. Die im Folgenden angegebenen, auf neuesten Messungen beruhenden Werte für $[\alpha]$ (gemessen mit der grünen Hg-Linie 546) gelten daher nur bei genauer Einhaltung der Versuchsbedingungen.

Spezifische Drehung des Isocitrat/Citrat-Gemisches 1:9. Bei Gegenwart von Molybdat. Konzentration der Isocitronensäure:

0.02 m	$[\alpha] = 870^\circ$
0.01 m	$[\alpha] = 785^\circ$
0.004 m	$[\alpha] = 740^\circ$
0.002 m	$[\alpha] = 650^\circ$

Während die unphysiologische *trans*-Form der *Aconitsäure* schon mehrfach aus pflanzlichem Material (118) und aus Bakterienkulturen (119) isoliert worden ist, konnte das Vorkommen der *cis*-Säure nur indirekt erschlossen werden, da die freie Säure sich sehr leicht in die beständigere *trans*-Form umlagert. Die Salze der *cis*-Säure sind dagegen bei physiologischen Wasserstoffionenkonzentrationen sehr viel stabiler (113), als man nach den Angaben der Entdecker (120) über die Stabilität der Säure zunächst annehmen konnte. Unter bestimmten Bedingungen findet sogar spontane Umlagerung *trans-cis* statt (113,121). Die analytische Bestimmung kann durch quantitative Hydrierung zu Tricarballoylsäure erfolgen (122); über die Bestimmung der Summe von *cis*-Aconitrat + Isocitrat vgl. (113). Präparativ ist eine Trennung der Isomeren über das Sr-Salz möglich (121).

Die Einwirkung tierischer oder pflanzlicher Gewebe oder Gewebsextrakte auf eine dieser drei Säuren führt zu einer teilweisen Umlagerung in die beiden anderen bis zur Erreichung eines Endgleichgewichtes (108,110). Dies liegt nach den ziemlich übereinstimmenden Befunden von Martius und Leonhardt (112) bzw. Krebs und Eggleston (113) bei 89.2(89.5)% Citronensäure, 7.7(6.2)% Isocitronensäure und 3.1(4.3) *cis*-Aconitsäure. Vom pH der Lösung scheint die Lage dieses Gleichgewichtes nicht wesentlich beeinflusst zu werden (123); das Gleiche gilt für den Einfluss der Temperatur.

Der Reaktionsverlauf bei Einwirkung des Enzymes auf eines der Substrate in reiner Form ist verschieden. Analoge Reaktionsabläufe sind bisher nur bei nicht-enzymatisch verlaufenden Umlagerungen, wie bei der Mutarotation der Glucose beobachtet worden (124).

Verfolgt man polarimetrisch die Umwandlung Citronensäure \rightarrow Isocitronensäure, so erhält man Kurven nach Abb. 3 (108). Die Reaktion beginnt mit maximaler Geschwindigkeit, um dann exponentiell bis zum Gleichgewichtsendwert abzufallen. Dieser zeitliche Reaktionsablauf schliesst aus, dass die Aconitsäure zwangsläufig Durchgangsstufe bei der Isocitronensäurebildung ist, da in diesem Falle anfänglich eine kurze Induktionsperiode zu beobachten sein müsste (punk-

freier Aconitsäure von dem einen zum anderen Enzym zur Voraussetzung hätte.

Verfolgt man die enzymatische Reaktion indem man von reiner *cis*-Aconitsäure oder Isocitronensäure ausgeht, so beobachtet man einen sehr eigenartigen Ablauf (108). In beiden Fällen nimmt die Menge gebildeter Citronensäure ständig zu, während die der zweiten daneben entstehenden Säure durch ein ausgeprägtes Maximum läuft. Abb. 4 zeigt das für den Fall der Aconitsäure als Ausgangsmaterial.

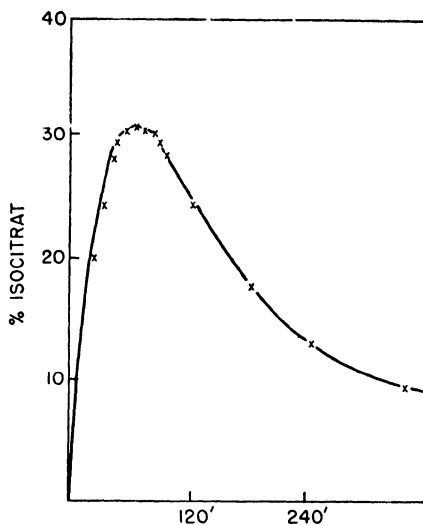


Abb. 4 Kinetik der Reaktion *cis*-Aconitat-Isocitrat. m/10 *cis*-Aconitat, 10 ml Leberextrakt/100 ml Versuchsansatz, pH 7.4, 37°C. Kurve berechnet nach Gl. Seite 196.

Man kann dieses Verhalten vorteilhaft ausnützen zur Darstellung der optisch aktiven Isocitronensäure, indem man im Augenblick maximaler Bildung von Isocitrat die Reaktion unterbricht und die Säure über den Laktonester isoliert (108).

Startet man mit Isocitronensäure, so erhält man analoge Kurven für die Bildung und das Verschwinden von Aconitsäure. Die auch hier mit maximaler Geschwindigkeit einsetzende Citronensäurebildung zeigt anfangs ebenfalls wieder keine Abhängigkeit von der Menge gleichzeitig gebildeter und anwesender Aconitsäure, was wiederum für einen Reaktionsverlauf im Sinne der Gl. 1 spricht (125).

Der beobachtete zeitliche Verlauf der Aconitawirkung lässt sich deuten durch die Annahme einer Zwischenverbindung von Ferment und Substrat, die in monomolekularer Reaktion in Citronensäure,

cis-Aconitsäure oder Isocitronensäure und Ferment zerfällt und auch in (scheinbar) monomolekularer Reaktion aus den drei Komponenten gebildet wird; unter den Versuchsbedingungen besteht keine Abhängigkeit der Bildungsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration. Die mathematische Behandlung der Reaktionskinetik führt auf drei simultane lineare Differentialgleichungen, als deren Lösung entsprechend drei Exponentialfunktionen auftreten, von denen aber eine so rasch abfällt, dass sie zu vernachlässigen ist. Der zeitliche Ablauf wird also durch zwei überlagerte Exponentialfunktionen wiedergegeben, womit die experimentellen Befunde gut übereinstimmen. So wird z.B. der beobachtete Anstieg und Wiederabfall der Isocitronensäure, wenn Aconitsäure als Ausgangsmaterial gewählt wird, befriedigend dargestellt durch die Gleichung (125):

$$I = 0.600e^{-1.2t} - 0.677e^{-1t} + 0.077$$

D. DER "UNSYMMETRISCHE" ABBAU DER CITRONENSÄURE

Wie schon mehrfach erwähnt wurde, ist aus den verschiedenen Versuchen mit isotope markierter Essigsäure und Oxalessigsäure, die der in den Citronensäurecyclus führenden Kondensationsreaktion unterworfen worden waren, der Schluss gezogen worden, dass die symmetrisch gebaute Citronensäure nicht Primärprodukt der Reaktionskette sein könne (15,16). Denn wenn man von markierter Essigsäure CH_3COOH ausging, fand sich das isotope C-Atom beim Übergang α -Ketoglutarsäure \rightarrow Bernsteinsäure fast vollständig in letzterer wieder, während es umgekehrt bei diesem Schritte verloren ging, wenn man es als CO_2 d.h. aber über Oxalessigsäure eingeführt hatte. Da sich die eingeführten isotopen C-Atome in den primären Carboxylgruppen der Isocitronensäure befunden haben mussten, schied diese Säure bei der Diskussion, welches das erste Reaktionsprodukt sein könnte aus, und man hat angenommen (15), dass dieses *cis*-Aconitsäure sein müsse. Die Citronensäure aber liege nur im Nebenschluss wie etwa die Milchsäure bei der Glycolyse (siehe Schema Seite 168).

Zur experimentellen Erhärtung dieser Hypothese ist von Krebs (126) angegeben worden, dass die Geschwindigkeit der Reaktion *cis*-Aconitsäure \rightleftharpoons Isocitronensäure bei niedrigen Konzentrationen sehr viel grösser sei als die der Reaktion *cis*-Aconitsäure \rightleftharpoons Citronensäure. Die erste der beiden Reaktionen sei bei 0.5 molarer Konzentration der Aconitsäure 1.5 mal, bei 0.03 molarer 4 mal und bei 0.001 molarer sogar 10 mal schneller als die der zweiten gleichzeitig verlaufenden. Unter physiologischen Bedingungen werde daher aus primär entstandener

Aconitsäure fast nur Isocitronensäure gebildet, deren Abbau mit der Bildung Schritt halte. Diese Angaben konnten indessen nicht bestätigt werden (125). Im Konzentrationsbereich von $m/5$ – $m/250$ *cis*-Aconitsäure wurde das Verhältnis der Geschwindigkeiten der Wasseranlagerung an die Doppelbindung als konstant gefunden (was auch theoretisch sehr viel wahrscheinlicher erscheint). Dabei verläuft die Bildung der Isocitronensäure nur etwa 1.2 mal so schnell als die der Citronensäure. Dann müssten aber rund 22% der reagierenden Aconitsäure nach der "falschen" Seite hin abgebaut werden.

Auch ein zweiter, von Krebs zur Stütze der Aconitsäuretheorie herangezogener Versuch konnte nicht bestätigt werden. Von der Überlegung ausgehend, dass, wenn Citronensäure erst sekundär aus Aconitsäure und Isocitronensäure entstünde, dann zu Anfang eine Anhäufung dieser beiden Säuren zu beobachten sein müsste über den Wert von 11% hinaus, den die Summe ihrer Gleichgewichtswerte ausmacht, wurden Synthesansätze nach kurzer Reaktionszeit unterbrochen und der Gehalt an Citronensäure sofort und nach längerer Inkubation mit aconitasehaltigen Präparaten bestimmt. Ein beträchtliches Plus im zweiten Falle wurde als Beweis für eine anfängliche Anhäufung der beiden anderen Säuren und damit als Bestätigung der Aconitsäuretheorie angesehen. In entsprechend angeordneten Versuchen (C.M. unveröffentlicht), in denen in der zweiten Phase durch Zusatz von Arsenit oder Selenit die Weiterbildung von Citronensäure aus Oxalacetat und Pyruvat mit Sicherheit unterbunden worden war, konnten indessen niemals derartige Effekte beobachtet werden.

Damit ist die Aconitsäuretheorie aber als nicht mehr haltbar zu bezeichnen, umso mehr als eine Reihe anderer Beobachtungen ebenfalls gegen sie sprechen (vgl. 128) und, wie Ogston (129) gezeigt hat, überhaupt kein zwingender Grund besteht, aus den Isotopenversuchen den Schluss abzuleiten, dass Citronensäure nicht Primärprodukt des Zyklus sein könne. Denn es ist wie Ogston gezeigt hat, falsch anzunehmen, dass die identischen Gruppen einer symmetrischen Verbindung, die aus einer optisch aktiven Vorstufe hervorgegangen ist (oder, was auf dasselbe hinausläuft, die an einem optisch aktiven Ferment entstanden ist), überhaupt nicht unterschieden werden könnten, weil sie mit den üblichen chemischen und physikalischen Methoden nicht zu unterscheiden sind. Ein ja immer asymmetrisches Enzym, das sich mit einer symmetrischen Verbindung kombiniert, kann das aber unter zwei sehr plausiblen Voraussetzungen: (1) dass das Enzym die symmetrische Verbindung an drei Stellen bindet, und (2) dass die beiden Punkte, an denen die identischen Gruppen des Substrates gebunden sind, sich in ihrer katalytischen Wirksamkeit unterscheiden. In dem Schema Abb. 5 etwa darf die Abspaltung von H_2O nur innerhalb des von a' und b' eingeschlossenen Atomgruppenbereiches stattfinden.

Eine experimentelle Bestätigung dieser Theorie gaben Potter und Heidelberger (130), die aus Pyruvat und $C^{14}O_2$ mittels Leberhomonisat zuerst Citronensäure synthetisierten und die isolierte Säure dann enzymatisch weiter abbauten. Der Abbau verlief programmgemäss ganz unsymmetrisch nach der "Oxalessigsäureseite" hin.

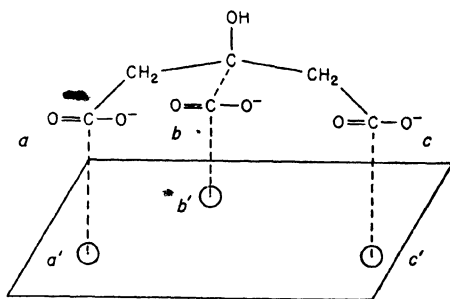
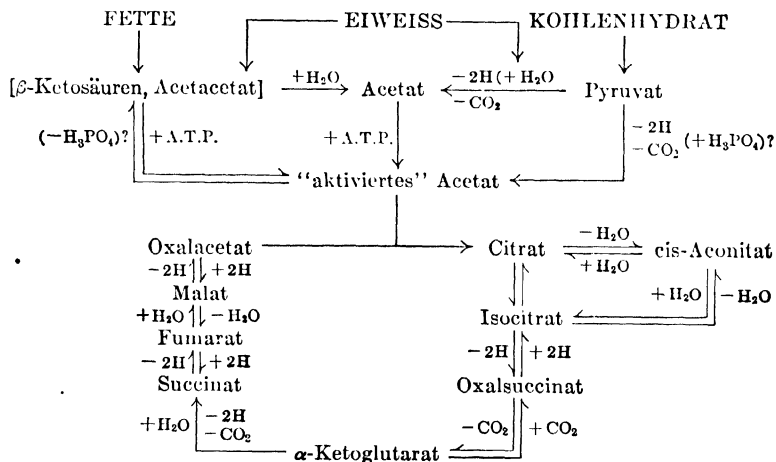


Abb. 5.

Eine von Martius und Schorre rein synthetisch hergestellte, also "racemische" Di-Deuterocitronensäure ($HOOC-CH_2-COH(COOH)-CD_2-COOH$) wurde dagegen genau symmetrisch abge-



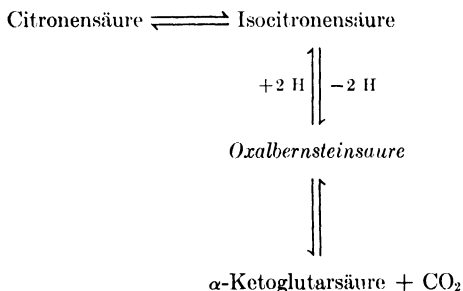
Revidiertes Schema des Citronensäurezyklus.

baut, obwohl bei der bekannten geringeren Reaktionsgeschwindigkeit des Deuteriums der Abbau nach der CD_2 -Seite hin an sich schwerer gehen sollte als nach der CH_2 -Seite hin (131).

Man darf also unter Berücksichtigung dieser Tatsachen die Citronensäure wieder an die erste Stelle des Cyklus rücken und daher mit Recht wieder von einem *Citronensäure-* statt Tricarbonsäurecyklus sprechen. Das Schema auf Seite 198 fasst die seit 1943 gemachten neuen Erkenntnisse zusammen.

V. Oxalbernsteinsäure—Ochoa-Reaktion

In seinen systematischen Untersuchungen über die Citronensäurebildung im Herzmuskel machte Hallmann (53) eine zunächst unerklärliche Beobachtung. Er fand nämlich die höchsten Citratausbeuten nicht etwa beim Bebrüten von Pyruvat und Oxalacetat, wie man es nach der seinerzeit allein diskutierten Vorstellung erwarten sollte, sondern beim Bebrüten des Gewebes mit α -Ketoglutarsäure, konnte aber den Weg dieser Synthese nicht finden. Erst die Arbeiten Ochoas (132), die von einer ganz anderen Fragestellung ausgingen, brachten die von Hallmann vergeblich versuchte Deutung. Danach können dieselben Enzyme, welche Citronensäure abbauen, auch umgekehrt ihren Aufbau vermitteln.



Am Angelpunkt der Reaktionskette steht Oxalbernsteinsäure, das von Martius (14) vorausgesagte Dehydrierungsprodukt der Isocitronensäure.

A. DARSTELLUNG UND EIGENSCHAFTEN DER OXALBERNSTEINSÄURE

Zur Darstellung der Oxalbernsteinsäure ist man auf synthetische Methoden angewiesen. Als Ausgangsmaterial dient der nach der Vorschrift von Wislicenus synthetisierte Triäthylester, aus welchem Lynen und Seherer (133) durch Versei-

fung mit konzentrierter Salzsäure, Fällung und Fraktionierung der in verdünntem Alkohol unlöslichen Bariumsalze, Zerlegung mit Schwefelsäure und Krystallisation aus Essigester-Chloroform die reine Säure vom Schmp. 80–81° gewinnen konnten (Abb. 6). Da es aber für die Mehrzahl der enzymatischen Versuche nicht unbedingt nötig ist mit der reinen Säure zu arbeiten, kann man sich häufig mit dem rohen, im trocknen Zustand haltbaren Bariumsalz begnügen, wie es auch von Ochoa (102) bereitet wurde.



Abb. 6. Krystallisierte Oxalbernstensäure ($\times 15$) (134).

Im Gegensatz zur Oxalessigsäure krystallisiert Oxalbernstensäure in der Ketoform (I) und erst in Lösung tritt teilweise Enolisierung zu Oxyaconitsäure (II) ein (134).



Eine für die biologische Reaktionsweise charakteristische Eigenschaft der wässrigen Lösung von Oxalbernstensäure ist ihr Zerfall zu α -Ketoglutarensäure und CO_2 , wie er im sauren Gebiet und am Neutralpunkt aber auch in alkalischer Lösung bis etwa p_H 13 beobachtet wird. Seine Geschwindigkeit hängt selbstverständlich von der Temperatur, daneben aber ganz ausgeprägt vom p_H der Lösung ab (Tabelle 6) (133).

TABELLE 6

STABILITÄT VON OXALBERNSTEINSÄURE IN WÄSSRIGER LÖSUNG (133,134)

Temperatur	p _H	k*	Halbwertszeit (in Minuten)
30°	n/10-NaOH	0.032	22
30°	2.7†	0.148	4.7
30°	6.0	0.042	16
20°	6.0	0.013	52

* k = Geschwindigkeitskonstante für die monomolekulare Zerfallsreaktion.

† Acidität einer 5.8×10^{-3} mol. Lösung von Oxalbernsteinsäure in Wasser.

Noch bedeutungsvoller in biologischer Hinsicht ist die Tatsache, dass gewisse mehrwertige Metallionen schon in sehr kleiner Konzentration (m/1000) den Decarboxylierungsvorgang katalytisch beschleunigen, insbesondere die dreiwertigen Al⁺⁺⁺ und Fe⁺⁺⁺, sowie die zweiwertigen Cu⁺⁺ und Zn⁺⁺. Andere zweiwertige Metalle, wie Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ oder Ca⁺⁺ haben dagegen in gleicher Konzentration angewandt nur eine geringe Wirkung (102,133) (Tabelle 7).

TABELLE 7

WIRKUNG VON METALLEN AUF DIE DECARBOXYLIERUNG DER OXALBERNSTEINSÄURE (102)*

Zusatz	mm ³ CO ₂ in 5 Minuten entwickelt
Ohne	47
0.001 m-CaCl ₂	36
0.001 m-MgCl ₂	50
0.001 m-MnCl ₂	41
0.001 m-ZnSO ₄	76
0.001 m-CuSO ₄	187
0.001 m-FeSO ₄	110
0.001 m-FeCl ₃	245
0.001 m-Al ₂ (SO ₄) ₃	255

* 16 μMole Oxalbernsteinsäure in 0.18 m-Acetatpuffer, p_H 5.1, bei 25°.

Die Katalyse beruht auf der Fähigkeit der aktiven Kationen mit Oxalbernsteinsäure bzw. der damit im Keto-Enol-Gleichgewicht stehenden Oxyaconitsäure zu labilen Metallkomplexen zusammenzutreten, die unter Abspaltung von CO₂ rasch zerfallen. Während sich der Komplex mit Fe⁺⁺⁺ schon für das freie Auge durch eine intensive violettrote Farbe zu erkennen gibt (102,133), lässt sich die entsprechende Verbindung mit Al⁺⁺⁺ nur im Ultraviolett nachweisen, wo sie bei 250 mμ intensive Absorption zeigt (135) (Abb. 7), die aber, wie auch die Färbung mit Fe⁺⁺⁺, infolge Decarboxylierung der Säure rasch verblasst. Die wenig aktiven Mn⁺⁺ oder Mg⁺⁺ verändern das Absorptionsspektrum der Oxalbernsteinsäure nur geringfügig (vgl. Abb. 8. S. 202), ein Beweis dafür, dass die geringe

katalytische Fähigkeit mit ihrem Unvermögen zur Komplexbildung in direkter Beziehung steht.

Um Oxalbernsteinsäure quantitativ zu bestimmen, gibt es zwei Verfahren. Bei der manometrischen Methode (102,133) wird das durch Anilin in saurer Lösung abgespaltene CO_2 in der Barcroft-Warburg-Apparatur gemessen, während die optische Methode (134) sich der Absorption bei $270 \text{ m}\mu$ des mit $n/10$ -Natronlauge gebildeten Enolat-Ions der Oxaconitsäure bedient.

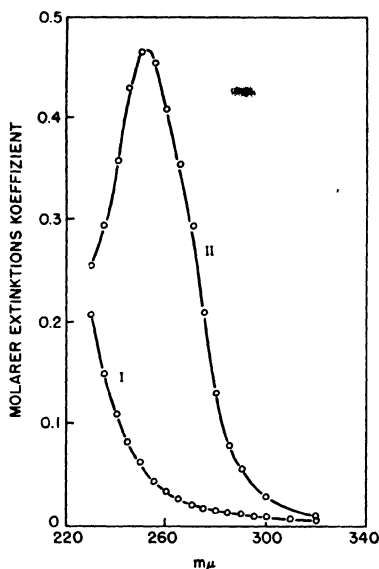


Abb. 7. Absorptionsspektren der Oxalbernsteinsäure und ihres Aluminiumkomplexes bei pH 7.3 (135): (I) 5×10^{-4} m-Oxalsuccinat; (II) 5×10^{-4} m-Oxalsuccinat und 2.5×10^{-1} m- $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

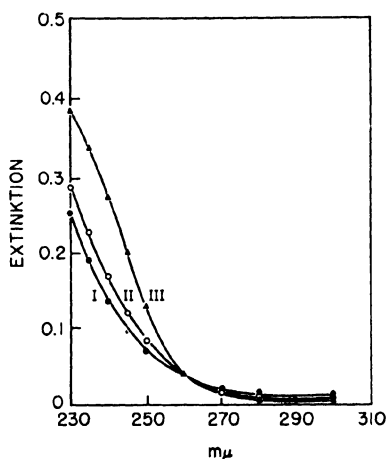


Abb. 8. Absorptionsspektrum des Carboxylase-Oxalbernsteinsäure-Komplexes (135): (I) Oxalsuccinat; (II) Oxalsuccinat und 1.67×10^{-4} m- MnCl_2 ; (III) Oxalsuccinat, MnCl_2 und 0.2 cm^3 Enzym (Schweineherzextrakt). 1.67×10^{-4} m-Oxalsuccinat, pH 7.3 in 3 cm^3 , Schichtdicke 1 cm.

B. OXALBERNSTEINSÄURE-CARBOXYLASE

Wenn auch Oxalbernsteinsäure in wässriger Lösung wenig beständig ist und einer raschen Decarboxylierung unterliegt, so reicht die Geschwindigkeit des Spontanzerfalls doch nicht aus, um damit den Umsatz in der Zelle zu erklären. Hier ist vielmehr eine spezifische Oxalbernsteinsäure-Carboxylase am Werk, die Ochoa und Weisz-Tabori (136) in Extrakten aus Schweineherz und davon unabhängig

Lynen und H. Scherer (137) in Extrakten aus Pferdeleber entdeckten. Darüber hinaus ist das Ferment in der belebten Natur weit verbreitet, denn es konnte in Taubenbrustmuskel (136), Niere (133, 136), Gehirn (136), Hefe (133), *Aspergillus niger* (133) und höheren Pflanzen (138) nachgewiesen werden, dürfte aber zweifellos allgemein in allen Zellen enthalten sein, in denen der Citronensäurecyclus eine Rolle spielt.

TABELLE 8

VORKOMMEN DER OXALBERNSTEINSÄURE-CARBOXYLASE IN TIERISCHEN ORGANEN (136)

Gewebe	Q_{CO_2} *
Schweineherz.....	840
Taubenbrustmuskel....	740
Schweineniere.....	230
Schweineleber.....	80
Taubenleber.....	60
Ochsenhirn.....	94
Affenhirn.....	45

* Q_{CO_2} = cmm CO_2 entwickelt pro Stunde und mg Protein; der Berechnung wurde das in den ersten 5 Minuten über den Spontanzerfall hinaus entwickelte CO_2 zu Grunde gelegt.

Die höchste Konzentration erreicht es im Schweineherz und im Brustmuskel der Taube (Tabelle 8), so dass diese Organe in erster Linie als Ausgangsmaterial für die Darstellung des Ferments in Betracht kommen. Grafflin und Ochoa (139) stellten aus einem Acetonpräparat aus Schweineherz in zwei Stufen, bestehend aus Fraktionierungen mit Ammonsulfat und mit Alkohol, ein gegenüber dem Rohextrakt sechsfach angereichertes Enzympräparat dar. Ein etwa viermal weniger wirksames Enzympräparat gewannen Lynen und Scherer (133) aus Pferdeleber, doch war hier, wegen der sehr viel geringeren Aktivität des Ausgangsmaterials eine 130-fache Anreicherung durchzuführen.

Die bisher reinste Enzymlösung aus Schweineherz, die keine Aconitase, wohl aber noch Isocitrico-Dehydrase enthält (vgl. S. 212) ist wenig beständig und büsst schon bei 0° ihre Wirksamkeit innerhalb kurzer Zeit ein. Zwar lässt sich aus der eingefrorenen Lösung im Hochvacuum ein haltbares Trockenpräparat bereiten, doch geht bei dieser Prozedur nahezu die Hälfte der Aktivität verloren.

Das Ferment besitzt ein breites Wirksamkeits-Optimum zwischen p_H 5.6 und 7.4 (133,136) und wird erst bei p_H 5.0 infolge Denaturierung weitgehend inaktiv. Seine Spezifität ist ausgeprägt, denn es reagiert ausschliesslich mit Oxalbernsteinsäure und verhält sich sogar der dazu in naher Verwandtschaft stehenden Oxallessigsäure gegenüber vollkommen indifferent (136).

Schon bei Versuchen mit rohen Enzymlösungen stellte sich heraus, dass die Oxalbernsteinsäure-Carboxylase kein einfaches Protein, sondern ein konjugiertes dissoziierendes Metallprotein ist. Das gereinigte Carboxylaseprotein ist katalytisch unwirksam und wird erst zum Ferment durch Vereinigung mit Salzen des Mangans (133, 136) oder des Cobalts (140). Das im Leben mit dem Protein verbundene Metall ist wahrscheinlich Mangan, mit dem das Protein aus Pferdeleber zur Hälfte gesättigt ist, wenn die Mangansalzkonzentration in der Lösung 2.9×10^{-5} (Mole/Liter) beträgt (133).

Ob auch Magnesium mit dem Protein reagiert, ist noch nicht endgültig entschieden. Zwar kann Magnesium, in äquivalenter Menge angewandt, Mangan nicht ersetzen (133,136), doch es besteht noch die Möglichkeit, dass die Affinität des Proteins zum Magnesium kleiner ist und somit erst bei höherer Konzentration ein aktives Magnesiumprotein gebildet wird. Damit würde eine alte Beobachtung aus dem Laboratorium von Euler (141) eine Erklärung finden, wonach bei der enzymatischen Dehydrierung von Isocitronensäure zu α -Ketoglutaräure und CO_2 unter anderem auch Mn^{++} notwendig ist, dieses aber durch grössere Mengen Mg^{++} ersetzt werden kann.

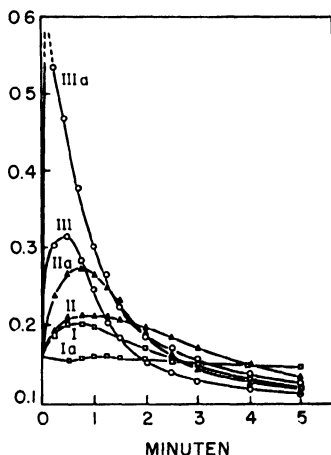
Wenn die Carboxylase Oxalbernsteinsäure spaltet, so kommt diese Wirkung über die Bildung eines ternären Komplexes aus Carboxylaseprotein, Mangan und Oxalbernsteinsäure zustande. Lynen und Scherer (133) bestimmten aus kinetischen Daten die Dissoziationskonstante der Ferment-Oxalbernsteinsäure-Verbindung und fanden bei 30° und p_H 6.0 für das Ferment aus Pferdeleber den Wert:

$$D = \frac{c_{(OBS)} \cdot c_{(Ferment)}}{c_{(Ferment \cdot OBS)}} = 1.2 \times 10^{-3} \text{ (Mole OBS/Liter)}$$

Noch überzeugender ist aber der direkte spektrophotometrische Nachweis dieser ternären Verbindung, der Kornberg, Ochoa und Mehler (135) gelang. Wie aus Abb. 8 zu ersehen ist, die ein Ergebnis ihrer Messungen wiedergibt, verändert Mn^{++} allein das Spektrum von Oxalsuccinat nur geringfügig (vgl. S. 202), wird aber nun ausserdem noch das Carboxylaseprotein zugesetzt, dann steigt die Absorption beträchtlich an. Durch Messungen bei $240 m\mu$ lassen sich Bil-

dung und Zerfall des Komplexes sehr schön verfolgen (Abb. 9). In den ersten Sekunden nach Zusammengeben der drei Komponenten nimmt die Absorption kräftig zu, um nach Durchschreiten eines Maximums anschliessend dann nach Massgabe der Decarboxylierungsgeschwindigkeit bis zu einem, der gebildeten α -Ketoglutar-säure entsprechenden Wert abzunehmen. 0.134 m-Kaliumchlorid

Abb. 9. Spektrale Veränderungen während der enzymatischen Decarboxylierung von Oxalbernsteinsäure (135): (I) Oxalsuccinat und $MnCl_2$; (II) Oxalsuccinat und 0.1 cm³ Enzym (Schweineherzextrakt); (III) Oxalsuccinat, $MnCl_2$ und Enzym. 1.67×10^{-4} m-Oxalsuccinat, 1.67×10^{-4} m- $MnCl_2$ in 3 cm³, Schichtdicke 1 cm, Wellenlänge 240 m μ . Ia, IIa und IIIa wie I, II und III, aber jeweils mit 0.134 m-KCl.



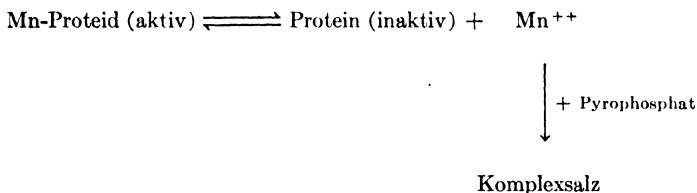
verändert das Bild in charakteristischer Weise, indem es einerseits die mit Mn^{++} allein zu beobachtende Extinktionszunahme verhindert, auf der anderen Seite aber die Erscheinungen potenziert, wie sie nach Zugabe von Carboxylaseprotein und Mn^{++} zusammen auftreten. Diese Aktivierung durch Kaliumchlorid, die sich auch manometrisch in einer erhöhten CO_2 -Entwicklung kundtut, beruht auf einem unspezifischen Ioneneffekt und lässt sich in gleicher Weise auch mit Kaliumbromid oder Kochsalz erzielen. Im übrigen gibt sich auch spektrophotometrisch die Spezifität des Proteins für Mangan zu erkennen; in entsprechenden Versuchen mit Magnesium tritt zwar nach Zugabe des Kations allein noch dieselbe geringfügige spektrale Veränderung ein wie nach Zugabe von Mn^{++} , aber hier lässt sich dieser Effekt durch Zugabe von Protein nicht verstärken.

Kornberg, Ochoa und Mehler sprechen im Zusammenhang mit den spektrophotometrischen Messungen zwar nur von einem Oxalsuccinat-Mangan-Komplex, dessen Bildung und Zerfall durch das Carboxylaseprotein beschleunigt werden. Da dies aber nur möglich

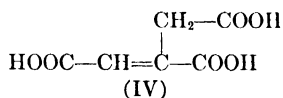
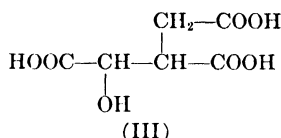
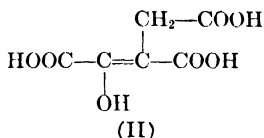
ist, wenn sich das Eiweiss selbst aktiv am Komplex beteiligt, dürfte es zweifellos richtiger sein die beobachteten starken Extinktionen auf die Entstehung einer ternären Verbindung zurückzuführen. Damit wird es auch verständlich, warum die Höhe des sich während des Versuchs ausbildenden Absorptionsmaximums in direkter Proportion zum zugesetzten Enzym steht, ebenso wie die in den ersten Sekunden nach Mischen der drei Komponenten zu beobachtende Extinktionszunahme.

Auf dieser direkten Beziehung, die zwischen Fermentmenge und Extinktionsanstieg während 15 Sekunden besteht, bauten Grafflin und Ochoa (139) einen optischen Test zur Bestimmung des Carboxylaseproteins auf, welcher gegenüber der sonst angewandten manometrischen Messung der CO₂-Entbindung (133,136) den Vorzug hat, weniger Zeit zu beanspruchen, empfindlicher und auch bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion anwendbar zu sein.

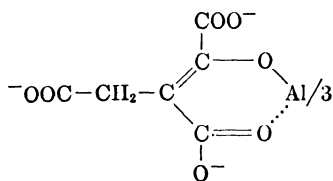
Im Zusammenhang mit der Frage nach Aufbau und Wirkungsmechanismus der Carboxylase sind auch Versuche über die Fermenthemmung durch Pyrophosphat und Isocitronensäure aufschlussreich gewesen. Pyrophosphat wirkt, indem es freies Mangan durch Komplexbildung abfängt und damit das Fermentgleichgewicht im Sinne der Dissoziation verschiebt (133).



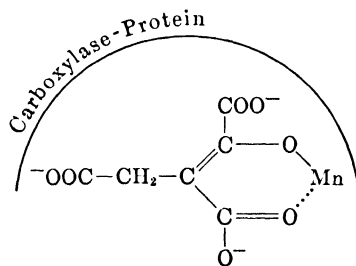
Isocitronensäure hingegen hemmt das Ferment durch Konkurrenz (136,139); es setzt sich an jene Stelle des Proteins, an der sonst Oxalbernsteinsäure gebunden wird und verdrängt damit das Substrat aus dem ternären Komplex. Man kann daraus den Schluss ziehen, dass das Substrat in der Enolform, d.h. als Oxyaconitsäure (II), mit dem Ferment reagiert, denn zwischen dieser und Isocitronensäure (III) besteht strukturelle Verwandtschaft. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass auch *cis*-Aconitsäure (IV) eine Hemmung ausübt, wenn auch in wesentlich schwächerem Masse als Isocitronensäure (136).



Auch auf Grund der spektrophotometrischen Messungen muss man annehmen, dass die Fermentreaktion von Oxyaconitsäure ausgeht. Denn die Versuche Ochoas und seiner Mitarbeiter (135) haben ergeben, dass die fermentative Katalyse mit Mn^{++} in Parallele gesetzt werden darf zur reinen Metallkatalyse durch Fe^{+++} oder Al^{+++} und beide Male die Reaktion durch Bildung eines Metallkomplexes eingeleitet wird. Dem Komplex mit Aluminium dürfte die Struktur (V) zukommen, so dass man für den Fermentkomplex eine ganz analoge Formulierung (VI) ins Auge fassen könnte.



(V) Aluminiumkomplex



(VI) Fermentkomplex (?)

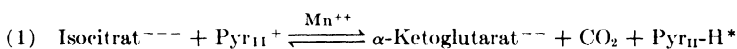
Auf diese Weise käme man zu einer einfachen Erklärung für die Funktion des Carboxylaseproteins. Während die dreiwertigen Kationen ganz ausgesprochen zur Komplexbildung mit Oxalsuccinat bzw. dem damit im Gleichgewicht stehenden Oxyaconitat befähigt sind, verfügt freies Mn^{++} nur über eine geringe Affinität, so dass hier, wie man es nach dem Massenwirkungsgesetz erwarten muss, erst bei hohen Mangankonzentrationen der Komplex entsteht und damit ein katalytischer Effekt wahrnehmbar wird. Durch das Dazwischentreten des spezifischen Proteins, das gleichzeitig Mn^{++} und Oxyaconitsäure bindet, werden aber auch hier die Voraussetzungen geschaffen,

dass schon bei geringen Mangankonzentrationen ein Metallkomplex gebildet werden kann. Die Katalyse selbst beruht auf der Tatsache, dass für die verschiedenen Metallkomplexe der Oxalbernsteinsäure die Aktivierungsenergie der Decarboxylierung kleiner ist als für die freie Säure.

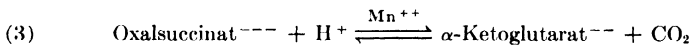
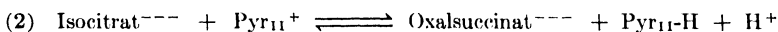
Durch die Beteiligung des Proteins ergibt sich für die Zelle ausserdem noch die Möglichkeit, die Decarboxylierung auch rückwärts laufen zu lassen und aus α -Ketoglutar Säure und CO_2 , wie es die Thermodynamik vorschreibt, in geringem Umfang Oxalbernsteinsäure zu bilden. Ohne Protein wäre eine solche Reaktion, da es sich ja dann um eine trimolekulare Reaktion handeln müsste, die von α -Ketoglutar Säure, CO_2 und Metall ausgehend, direkt zu einem Oxyacnitsäure-Metallkomplex führt, äusserst unwahrscheinlich.

C. CARBOXYLIERUNG VON α -KETOGLUTARSÄURE ZU OXALBERNSTEINSÄURE (OCHOA-REAKTION)

Die Umkehrung der enzymatischen Decarboxylierung von Oxalbernsteinsäure ist von Ochoa (132) bei seinen Arbeiten über die Dehydrierung der Isocitronensäure und das dabei wirksame Ferment-system entdeckt worden. Schon Adler, von Euler, Günther, und Plass (141) hatten gefunden, dass bei der Oxydation der Isocitronensäure durch Enzyme aus Leber der Wasserstoff von Codehydrase II übernommen wird, Mg^{++} oder das noch wirksamere Mn^{++} beteiligt sind und die Reaktion im Sinne des von Martius aufgestellten Schemas zu α -Ketoglutar Säure und CO_2 führt.



Ochoa (132), der diese Umsetzung unter Verwendung einer Enzym-lösung aus Schweineherz studierte, erkannte, dass es sich dabei um zwei, durch verschiedene, reversibel arbeitende Enzyme katalysierte Reaktionen handelt. Die erste Stufe, die eigentliche Oxydoreduktion, wird von der Isocitrico-Dehydrase geleistet und führt unter Übertragung des Wasserstoffs auf die Codehydrase zu Oxalbernsteinsäure, die dann erst an der Oxalbernsteinsäure-Carboxylase in α -Ketoglutar Säure und CO_2 aufgespalten wird. Nur an dem letzten Vorgang ist das Metall beteiligt.



* Pyr_{11}^+ bzw. $\text{Pyr}_{11}\text{-H}$ = oxyd. bzw. red. Codehydrase II.

In Abwesenheit von Mn^{++} stellt sich nur das Gleichgewicht (2) ein, wie sich optisch bei $340\text{ m}\mu$, wo Hydrocodehydrase II eine starke Absorptionsbande hat, verfolgen lässt. In Abb. 10 ist ein Versuch Ochoas (132) wiedergegeben. Nach dem Zusammengeben nahezu äquivalenter Mengen Isocitrat und Codehydrase II werden in Gegenwart des Ferments nur etwa drei Viertel des Coferments reduziert. Wird jetzt Oxalsuccinat zugefügt (Pfeil 2), dann verschiebt sich unter Oxydation eines Teils der zuvor gebildeten Hydrocodehydrase das Gleichgewicht

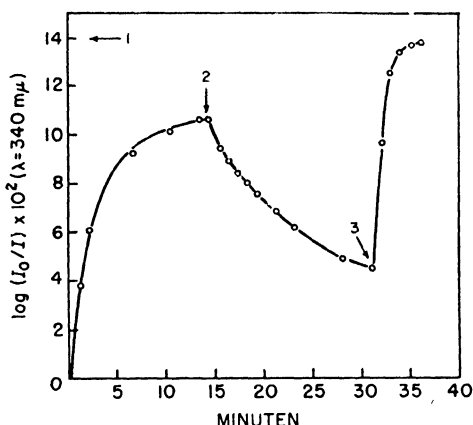


Abb. 10. Reversibilität der durch Isocitrico-Dehydrase katalysierten Reaktion (Reaktionsgleichung 2) (132): Pfeil 1, gibt die für vollständige Reduktion der Codehydrase zu erwartende Extinktion an; Pfeil 2, $0.495\ \mu\text{Mole}$ Oxalsuccinat zugesetzt; Pfeil 3, $1.8\ \mu\text{Mole}$ $MnCl_2$ zugesetzt. 0.01 cm^3 Herzextrakt, $0.109\ \mu\text{Mole}$ Isocitrat in 3 cm^3 0.01 m -Glycocollpuffer, pH 7.2, 23°C ., Schichtdicke 1 cm , Wellenlänge $340\text{ m}\mu$. Zur Zeit 0, $0.0744\ \mu\text{Mole}$ Codehydrase II zugesetzt.

nach links, und erst wenn die Oxalbernstensäure-Carboxylase durch Zugabe von Mn^{++} (Pfeil 3) in Funktion gesetzt wird, führt die Umsetzung unter nahezu quantitativer Eliminierung des Oxalsuccinats zur praktisch vollständigen Reduktion des Coferments.

Tatsächlich ist aber auch die Decarboxylierung des Oxalsuccinats eine Gleichgewichtsreaktion und damit natürlich auch die Gesamtreaktion (1), die Summe der Reaktionen (2) und (3). Den Beweis dafür erbrachte ein zweiter Versuch Ochoas (132), der in Abb. 11 wiedergegeben ist. Nach dem Mischen von Isocitrat, Codehydrase II, Mn^{++} und Enzym in einer Pufferlösung, die CO_2 -Bicarbonat

enthält, wird das Coferment schnell reduziert. Zugabe von α -Ketoglutarat (Pfeil 2) verschiebt das Gleichgewicht nach links, umso weiter je mehr α -Ketoglutarat zugesetzt wurde, und führt damit unter teilweiser Oxydation der Hydrocodehydrase zur Bildung von Isocitronensäure. Wird aber nun vermittels eines lebhaften Stickstoffstroms ein Teil des gelösten Kohlendioxyds aus dem Reaktionsgemisch

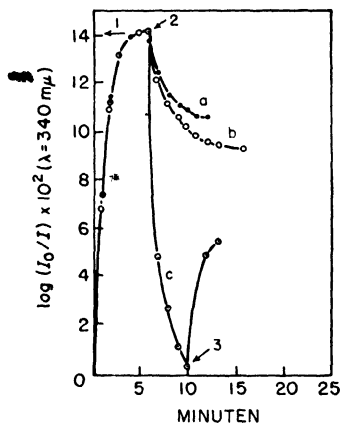
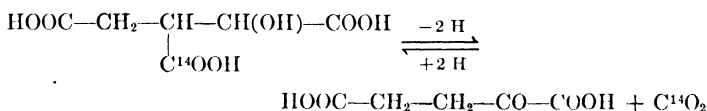


Abb. 11. Reversibilität der Gesamtreaktion (Reaktionsgleichung 1) (132): Pfeil 1 gibt die für vollständige Reduktion der Codehydrase zu erwartende Extinktion an; Pfeil 2, α -Ketoglutarat zugesetzt (a, 3.42 μ Mole; b, 6.84 μ Mole; c, 41.2 μ Mole); Pfeil 3, um CO_2 auszutreiben 1 Minute lang einen feinen N_2 -Strom durch die Lösung geblasen. 0.3 cm^3 0.1 m-Glycocollpuffer, pH 7.2, 0.3 cm^3 0.1 m- NaHCO_3 (mit 100% CO_2 gesättigt), 0.01 cm^3 Herzextrakt, 1.8 μ Mole MnCl_2 und 0.109 μ Mole Isocitrat auf 3 cm^3 , 22–24°C., Schichtdicke 1 cm; Wellenlänge 340 $\text{m}\mu$. Zur Zeit 0, 0.0744 μ Mole Codehydrase II zugesetzt.

entfernt (Pfeil 3), dann stellt sich sofort, unter abermaliger Reduktion von Codehydrase II ein neues Gleichgewicht ein.

Enzymlösungen aus Petersilienwurzeln verhalten sich vollkommen gleichartig, wie analoge, von Ceithaml und Vennesland (140) ausgeführte, spektrophotometrische Messungen ergaben. Darüber hinaus wiesen Vennesland und Mitarbeiter (140,142) die Reversibilität der Gesamtreaktion (1) auch noch durch Isotopen-Versuche nach. In Gegenwart von Mn^{++} , Codehydrase II und $\text{NaHC}^{14}\text{O}_3$ ergab sich bei Bebrütung eines Gemisches von Isocitrat und α -Ketoglutarat mit Extrakten aus Tauben-Acetonleber oder Petersilienwurzeln Aufnahme

von C¹⁴ in die β-Carboxylgruppe der Isocitronensäure. Obwohl kein Anhaltspunkt für einen Umsatz der Komponenten des Systems in zwei Stunden gegeben war, betrug der Isotopenaustausch doch 70% des vollen Gleichgewichtes.



Mit Hilfe der optischer Messungen liessen sich die Gleichgewichtskonstanten der Reaktionen (1) und (2) experimentell ermitteln und daraus jene der Reaktion (3) berechnen. Ochoa (132) fand bei p_H 7.2 und 23° folgende Werte:

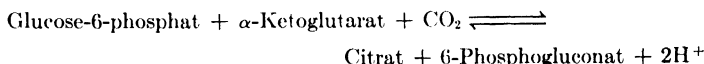
$$k_1 = \frac{(\text{Isocitrat})(\text{Pyr}^+)}{(\alpha\text{-Ketoglutarat})(\text{H}_2\text{CO}_3)(\text{Pyr-H})} = 1.3 \times 10^{-4}$$

$$k_2 = \frac{(\text{Isocitrat})(\text{Pyr}^+)}{(\text{Oxalsuccinat})(\text{Pyr-H})} = 0.3$$

$$k_3 = \frac{(\text{Oxalsuccinat})}{(\alpha\text{-Ketoglutarat})(\text{CO}_2)} = 1.3 \times 10^{-4}$$

Das Gleichgewicht der Decarboxylierungs- und Carboxylierungsreaktion (3) liegt somit zwar ganz auf der rechten Seite, d.h. in der Richtung der Decarboxylierung. Es kann aber in die entgegengesetzte Richtung verschoben werden, wenn Oxalsuccinat an der Dehydrase reduziert und damit aus dem Carboxylase-Gleichgewicht entfernt wird. Stellt somit *in vivo* oder *in vitro* irgend eine enzymatische Reaktion, wie z.B. die Dehydrierung von Glucose-6-phosphat an der spezifischen Dehydrase, reduzierte Codehydrase II zur Verfügung, dann kommt es über eine Fixierung von CO₂ an α-Ketoglutarensäure zur Bildung von Isocitronensäure, die anschliessend, falls auch noch Aconitase zugegen ist, zu 89% in Citronensäure übergeht.

Im Zusammenhang mit dieser Synthese der Citronensäure ist eine Betrachtung der energetischen Seite aufschlussreich, wie sie von Ochoa (58) für den Fall der von ihm auch experimentell untersuchten Oxydoreduktion zwischen Glucose-6-phosphat, α-Ketoglutarat und CO₂ angestellt wurde. An dieser Reaktion:



deren Gleichgewicht ganz nach der Seite der CO₂-Fixierung verscho-

ben ist, sind vier verschiedene Fermente beteiligt, die in Tabelle 9, zusammen mit den bei jedem Reaktionsschritt gebundenen oder freiwerdenden Energiebeträgen, aufgeführt sind.

TABELLE 9
CO₂-FIXIERUNG DURCH α -KETOGLUTARSÄURE (58)

Schritt	Reaktion	Enzym	Freie Energie $\Delta F'$ in cal
Carboxylierung	α -Ketoglutarat + CO ₂ \rightleftharpoons Oxalsuccinat	Oxalbernsteinsäure-Carboxylase	+4460
Reduktion	Oxalsuccinat + (Pyr-H + H ⁺) \rightleftharpoons Isocitrat + Pyr ⁺	Isocitrico-Dehydrodrase	+ 708
Reduktion der Codehydrase II	Glucose-6-ph. + Pyr ⁺ \rightleftharpoons 6-Ph.-Gluconat + Pyr-H + 2H ⁺	Glucosephosphat-Dehydrase	-6890
Isomerisierung	Isocitrat \rightleftharpoons Citrat	Aconitase	-1500
Bilanz aller vier Schritte	α -Ketoglutarat + CO ₂ + Glucose-6-ph. \rightleftharpoons Citrat + 6-Ph.-gluconat + 2H ⁺	—	-3200

Man erkennt, dass die Fixierung von CO₂ in diesem System nur möglich ist, weil die Energie für die endergone Carboxylierung der α -Ketoglutarensäure durch die stark exergone Dehydrierung des Glucose-6-phosphats aufgebracht wird.

Auf die Bedeutung der Ochoa-Reaktion bei der Chemo- und Photosynthese (58) soll im Rahmen dieser Zusammenfassung nicht eingegangen werden. Aber eine andere Tatsache muss unbedingt noch Erwähnung finden. Bisher ist vorausgesetzt worden, dass Isocitrico-Dehydrase und Oxalbernsteinsäure-Carboxylase zwei verschiedene Fermente sind. Tatsächlich sind aber Anzeichen dafür vorhanden, dass es sich hierbei um einen einheitlichen Eiweisskörper handelt, der beide Funktionen leistet. So war es Grafflin und Ochoa (139) bei der Isolierung der Fermente aus Schweineherz nicht möglich, die beiden Wirksamkeiten voneinander zu trennen. Die beiden Autoren fanden sogar, dass das Verhältnis der Dehydrase-Aktivität zur Carboxylase-Aktivität während der Reinigung konstant bleibt. Wenn auch in diesen Beobachtungen noch kein endgültiger Beweis für die Identität der beiden Enzyme gesehen werden darf—dazu ist die bisher erzielte Anreicherung der Fermentaktivitäten noch zu gering—so muss man doch ernstlich damit rechnen. Zumal ja auch die spezifische Hemmbarkeit der Carboxylase durch Isocitronensäure dafür spricht, dass das entsprechende Protein eine grosse Affinität zur Oxysäure

besitzt, und man dasselbe auch für die Dehydrase gefunden hatte (132, 141). Sollte sich diese Vermutung bestätigen, dann wäre der in der Enzymchemie ganz neue Fall gegeben, dass ein einziges Protein gleich mit zwei verschiedenen prosthetischen Gruppen reagiert, hier Codehydrase II und Mn^{++} , und dadurch zwei ganz verschiedene enzymatische Fähigkeiten erwirbt, die es auch unabhängig voneinander, einzeln betätigen kann.

VI. Effektoren der Fermente des Citronensäurecyklus

Da das komplette Fermentsystem des Citronensäurecyklus sich aus einer grossen Zahl von Einzelenzymen zusammensetzt, ist es klar, dass die Zahl der hemmend oder fördernd wirkenden Stoffe eine sehr grosse sein muss. Die folgenden Ausführungen beschränken sich daher auf die ersten Phasen des Cyklus.

Das Enzymsystem der Citronensäuresynthese. Es ist sicher, dass wir nicht von einem sondern von mehreren, mindestens zwei, verschiedenen solcher Systeme sprechen müssen, je nachdem der Partner der Oxalessigsäure aus Brenztraubensäure oder aus Essigsäure bzw. Acetessigsäure oder höheren β -Ketosäuren besteht, da die Fähigkeit zur Bildung von Citronensäure aus den verschiedenen Vorläufern je nach Gewebsart verschieden ist (59). Das schliesst natürlich nicht aus, dass wesentliche Komponenten beiden Systemen gemeinsam sind.

Eine der wichtigsten Fragen, die sich aufdrängen, wenn man sich mit der Beeinflussbarkeit dieser Fermentsysteme durch äussere Faktoren beschäftigt, ist die nach der Art ihres physikalischen Zustandes, der Abhängigkeit ihrer Wirksamkeit von diesem und dem Einfluss der ionalen Zusammensetzung des Milieus. Die systematische Bearbeitung dieses Problems ist erst in letzter Zeit in Angriff genommen worden, doch liegen schon eine Reihe Beobachtungen aus früherer Zeit vor.

Wenn man alle bisher gemachten Erfahrungen berücksichtigt, wird man geneigt sein, das auf Brenztraubensäure eingestellte Enzymsystem (im Folgenden System B genannt) unbedingt als Desmoenzym zu bezeichnen, da bisher noch in keinem Falle Enzymlösungen beschrieben worden sind, die imstande wären, Brenztraubensäure in Citronensäure zu überführen. Schwieriger liegt das Problem bei dem auf Acetacetat/Essigsäure eingestellten Enzymkomplex (System A).

Einerseits liegen neben älteren auch neuere, zuverlässige Angaben

vor, denenzufolge auch die Oxydation der Fettsäuren und der Oxybuttersäure nur an intakten Teilstrukturen der Zelle vor sich gehen kann (144,145). So haben insbesondere schonend isolierte Mitochondrien aus Leberzellen in letzter Zeit vielfach Verwendung gefunden zum Studium dieser Stoffwechselforgänge. Auf der anderen Seite werden ältere Beobachtungen, dass das Acetessigsäure in Citronensäure überführende Fermentsystem auch in wirksame Lösung zu bringen ist, durch neuere Versuche von Stern und Ochoa (128) scheinbar bestätigt. ~~Dem~~ diese konnten zeigen, dass es möglich ist mit Hilfe von Ammonsulfatfraktionen aus Extrakten getrockneter Taubenleber, in denen doch wohl kaum noch von intakten Strukturen die Rede sein kann, aus Essigsäure oder Acetessigsäure + Oxalessigsäure Citronensäure zu synthetisieren. Allerdings ist die Anwesenheit eines Phosphatdonators (A.T.P.) dabei nötig. Es ist daher wohl möglich, dass die Beobachtungen, die auf eine obligate Strukturgebundenheit auch dieses Enzymsystemes schliessen lassen, sich nur auf den sonst als Phosphatdonator wirkenden und ohne Zusatz von A.T.P. unentbehrlichen Komplex der Atmungsenzyme beziehen. Die von Lehninger (146) gefundene besonders grosse Empfindlichkeit der Esterifizierung von anorganischem Phosphat während der Atmung besorgenden Enzyme würde zu Gunsten einer solchen Auffassung sprechen.

Lässt man unter diesem Gesichtspunkt die Befunde von Stern und Ochoa ein Mal unberücksichtigt, so wird man sagen dürfen, dass bei beiden Systemen alle Faktoren, die die Struktur der Zelle oder bestimmter wirksamer Zellbezirke in gröberer Weise beeinflussen, die Bildung von Citronensäure hemmen oder aufheben.

Schon Hallmann (53) hatte gefunden, dass Trocknen, Behandlung mit Aceton oder Alkohol/Äther und der Zusatz oberflächenaktiver Stoffe wie Toluol die Citronensäure bildenden Fermente des Herzmuskels und der Niere inaktiviert. In gleicher Weise wirkt Einfrieren bei tiefer Temperatur (147). Interessanter als diese groben Einwirkungen ist der Einfluss der ionalen Zusammensetzung und der Ionenstärke des Milieus.

Am eingehendsten ist der Ioneneinfluss bisher wohl von Kennedy u. Lehninger an Lebermitochondrien studiert worden (144-5). Allerdings wurde hierbei nur die enzymatische Oxydation der Fettsäuren bis zur Stufe des Acetacetats verfolgt. Fast die gleichen Feststellungen konnten jedoch auch an Herzmuskelbrei und der Citratbildung aus Pyruvat und Oxalacetat gemacht werden (147). In beiden Fällen

bewirken Wasser und hypotonische Lösungen zunehmende Aktivitätsminderung. Bevor der Schwund der Aktivität aber schliesslich irreversibel wird, gelingt es durch Aufnehmen in isotonischer KCl-Lösung eine Reaktivierung herbeizuführen. (Im Gegensatz zu den Befunden von Kennedy und Lehninger zeigten bei Herzmuskel allerdings Ba^{++} und Sr^{++} zusätzliche Aktivierung bzw. bessere Konservierung, 147.) Dass es sich bei diesen Erscheinungen in erster Linie um osmotische und nicht um spezifische Ioneneinflüsse handelt, beweist die Tatsache, dass hypertonische Zuckerlösungen (0.88m-Rohrzucker) den gleichen oder überlegenen Effekt zeigen (145,146, 148).

Eine Sonderstellung in der Reihe der einfachen Ionen nimmt das Ca ein. Schon in niederen Konzentrationen hemmt es die Citronensäure-Synthese stark. Es liegt nahe, die bekannte hemmende Wirkung von Ca^{++} auf die Zellatmung hierauf zu beziehen, wengleich auch u.a. an die schon länger bekannte Hemmung der Dehydrierung von Isocitrat und Malat durch Ca^{++} (149) gedacht werden muss. Der Mechanismus dieses Effektes ist noch nicht untersucht worden, doch liegt es nahe, an Aktivierungen Phosphat-abspaltender Enzyme durch das Ca^{++} zu denken.

An die bekannte, auch im System der Citronensäure synthetisierenden Enzyme unentbehrliche Rolle des Magnesiums, braucht hier nur erinnert zu werden.

Weniger ist über die Wirkung von Anionen bekannt geworden. Mehrfach beobachtet wurde die fördernde Wirkung von HCO_3^- auf die Citronensäuresynthese. Eine Erklärung für diese Erscheinung wurde bisher noch nicht gegeben. Vielleicht wird sie in Richtung einer Beeinflussung der Ochoa-Reaktion zu suchen sein, durch Einflussnahme auf die Rückreaktion α -Ketoglutar säure + $CO_2 \rightleftharpoons$ Oxalbernsteinsäure.

Die gleichen Erwägungen, wie sie anlässlich der Frage nach der Strukturgebundenheit der synthetisierenden Fermente angestellt wurden, drängen sich auch bei der Betrachtung der Wirkung bekannter Enzymgifte auf. Schon Hallmann (53) hatte gefunden, dass die Citronensäurebildung in Herzmuskel und Niere durch Arsenit (0.002 m und darunter) vollständig gehemmt wird. Selenit wirkt gleich stark, hemmt aber dazu noch die Isocitricodehydrase. Weiterhin wurden starke Hemmungseffekte für Jodacetat und Azid angegeben (68,70). Fluorid dagegen ist fast wirkungslos (53).

Man wird im Falle des As_2O_3 geneigt sein, eine direkte Einwirkung auf die Pyruvodehydrase als Ursache der Hemmung anzunehmen. Bei den anderen Giften und dem Enzymsystem A liegt es aber vielleicht näher, ihre Wirkung im Sinne einer "Entkopplung" des eigentlichen kondensierenden Fermentes und derjenigen Prozesse, die die zur "Aktivierung" der 2C-Fragmente nötige Energie bereitzustellen haben, zu sehen. Die Befunde von Lehninger (146) über die Aufhebung der Esterifizierung von anorganischem Phosphat durch eine ganze Reihe von Enzymgiften, die zum grössten Teil auch die Citronensäuresynthese im negativen Sinne beeinflussen, stellen eine erwünschte Stütze dieser Auffassung dar.

Isocitricodehydrase. Die ersten Angaben über eine Hemmung der (Iso-)Citricodehydrase stammen von Collett u. Mit., die in Selenit und Tellurit sehr wirksame Enzymgifte fanden (vollständige Hemmung durch 0.004 m. Lösungen) (150). Kompetitive Hemmung durch *trans*-Aconitsäure hat Bernheim (151) festgestellt. Zu diesen Hemmstoffen ist in letzter Zeit noch die Fluoressigsäure gekommen, die nach einem sehr merkwürdigen Mechanismus spezifisch die Isocitricodehydrase ausschaltet, ohne die anderen Enzyme des Cyklus in vergleichbarer Weise zu beeinflussen.

Die von Bartlett, Barron und Kalnitsky (152-154) eingehender studierte Wirkung dieses Stoffes wurde von den genannten Autoren allerdings auf eine kompetitive Hemmung eines Essigsäure direkt oxydierenden Fermentes zurückgeführt, da sich in mit Fluoressigsäure vergiftetem Gewebe Essigsäure anhäuft, der Abbau von Fettsäuren auf dieser Stufe Halt macht und die Sauerstoffaufnahme stark zurückgeht. Die von den Autoren gemachte Annahme, dass die relative Kleinheit und Reaktionsträgheit des F-Atomes in der Fluoressigsäure zu einer so grossen Ähnlichkeit dieser Säure mit der Essigsäure führt, dass sie sie an der Enzymoberfläche zu verdrängen und so vor weiterem Abbau zu schützen vermag, muss allerdings dahin erweitert werden, dass die Folgen dieser Ähnlichkeit noch viel weiter reichen. Wie Liébercq und Peters (155) sowie Martius (156) unabhängig voneinander feststellten, muss man annehmen, dass die Fluoressigsäure zunächst in den Weg des Acetatabbaus hineingezogen wird, d.h. in den Cyklus eintritt. Martius konnte zeigen, dass mit Fluoracetat vergiftetes Gewebe (Herzmuskel) nicht mehr imstande ist, Citronensäure abzubauen und dass die Hemmung an der Isocitricodehydrase angreift. Unterbindet man durch Arsenit die Möglichkeit

der Bildung von Citronensäure und damit auch von Fluorcitronensäure, geht der Abbau ungestört vonstatten (Tabelle 10).

TABELLE 10

HEMMUNG DES CITRATABBAUS DURCH VERGIFTUNG MIT FLUORESSIGSAURE (FlAc)
(156)*

Zusatz	Citronensäure wiedergefunden
0.04 m-FlAc	26.5; 26.6 mg
0.01 m-FlAc	29.0 mg
0.001 m-FlAc	28.75 mg
—	0.8; 1.0; 7.0; 6.5 mg
0.001 m-As ₂ O ₃	6.4 mg
0.04 m-FlAc } 0.001 m-As ₂ O ₃ }	7.7; 8.8 mg

* Jeder Ansatz enthält 5 gr Herzmuskelbrei (Rind) und 25 mg Citronensäure 1.1% NaHCO₃, v = 16 ml. 120 Min. unter Sauerstoff geschüttelt. T = 37°.

Zu ähnlichen Schlüssen gelangten Liébercq und Peters (155) durch Versuche mit Homogenisaten von Meerschweinchenniere, wenn ihre Versuchsergebnisse auch noch keine genauen Angaben über den Ort des Eingreifens der Fluoressigsäure bzw. über die Natur des gebildeten Hemmstoffes zuließen. Sie konnten weiterhin (157) zeigen, dass in mit Fluoressigsäure vergifteten Tieren starke Anhäufung von Citronensäure in den Geweben zu beobachten ist. In Anbetracht der Tatsache, dass auch in Pflanzen (keimende Samen) die Fluoressigsäure ihre Giftwirkung entfaltet, ist es von besonderem Interesse, dass eine Pflanze (*Dichapetalum cymosum*) diese gar nicht einfach darzustellende Substanz enthält, wie einem Bericht von Peters zu entnehmen ist (158).

Literatur

1. C. Martius und F. Knoop, *Z. physiol. Chem.*, **246**, I (1937).
2. H. A. Krebs und W. A. Johnson, *Enzymologia*, **4**, 148 (1937).
3. F. Knoop und C. Martius, *Z. physiol. Chem.*, **242**, I (1936).
4. Literatur vgl. K. Bernhauer, *Die oxydativen Gärungen*, Berlin, 1932, p. 98; *Ergeb. Enzymforsch.*, **3**, 185 (1934).
5. H. Raistrick und A. B. Clark, *Biochem. J.*, **13**, 329 (1919).
6. A. I. Virtanen, *Ann. Acad. Sci. Fennicae*, **33**, 3 (1930).
7. L. Claisen und E. Hori, *Ber.*, **24**, 120 (1891).
8. R. Sonderhoff und H. Thomas, *Ann.*, **530**, 195 (1937).
9. H. Wieland und R. Sonderhoff, *ibid.*, **499**, 213 (1932).
10. A. I. Virtanen und J. Sundman, *Biochem. Z.*, **313**, 236 (1942/43).
11. R. Sonderhoff und M. Deffner, *Ann.*, **536**, 36 (1938).

12. H. Wieland, *Naturwissenschaften*, **34**, 111 (1947).
13. F. Lynen, *Ann.*, **554**, 40 (1943).
14. C. Martius, *Z. physiol. Chem.*, **247**, 104 (1937).
15. H. G. Wood, C. H. Werkman, A. Hemingway, und A. O. Nier, *J. Biol. Chem.*, **139**, 483 (1941); **142**, 31 (1941).
16. E. A. Evans, Jr., und L. Slotin, *ibid.*, **136**, 301 (1940); **141**, 439 (1941).
17. M. D. Kamen, *Ann. Rev. Biochem.*, **16**, 635 (1947).
18. S. Weinhouse und R. H. Millington, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 3089 (1947).
19. Übersicht in F. Knoop, *Oxydationen im Tierkörper*. Enke, Stuttgart, 1931.
20. H. A. Krebs, in *Advances in Enzymology*, Vol. III. Interscience, New York, 1943, p. 191.
21. R. Sonderhoff und M. Deffner, *Ann.*, **525**, 132 (1936).
22. F. Lynen und N. Neciullah, *ibid.*, **541**, 203 (1939).
23. H. H. Dixon und W. R. G. Atkins, *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, **14**, No. 1 (1913).
24. F. Lynen, *Ann.*, **539**, 1 (1939).
25. S. Windisch und C. Enders, *Brauwelt*, **1**, 151, 183, 202 (1946).
26. F. Lynen, *Ann.*, **552**, 270 (1942).
27. H. v. Euler, E. Adler, G. Günther, und L. Elliot, *Enzymologia*, **6**, 337 (1939).
28. C. Neuberg und M. Ringer, *Biochem. Z.*, **71**, 226 (1915); **91**, 131 (1918).
29. F. Lynen und W. Franke, *Z. physiol. Chem.*, **270**, 271 (1941).
30. F. Lynen, *unveröffentlichte Versuche*.
31. J. H. Quastel und W. R. Wooldridge, *Biochem. J.*, **22**, 689 (1928).
32. F. G. Fischer, *Angew. Chem.*, **51**, 82 (1938).
33. A. v. St. Györgyi, *Studies on Biological Oxidation and Some of Its Catalysts*, Leipzig, 1937.
34. F. Lynen und A. Pohl, *unveröffentlichte Versuche*.
35. I. Smedley-Maclean und D. Hoffert, *Biochem. J.*, **20**, 343 (1920).
36. H. Wieland und F. Wille, *Ann.*, **515**, 260 (1935).
37. F. G. Fischer und H. Eysenbach, *ibid.*, **530**, 99 (1937).
38. F. G. Fischer, A. Roedig, und K. Rauch, *ibid.*, **552**, 203 (1942).
39. F. Lynen, *ibid.*, **558**, 47 (1947).
40. K. A. C. Elliott und E. F. Schroeder, *Biochem. J.*, **28**, 1920 (1934).
41. K. A. C. Elliott, M. P. Benoy, und Z. Baker, *ibid.*, **29**, 1937 (1935).
42. K. A. C. Elliott, M. E. Greig, und M. P. Benoy, *ibid.*, **31**, 1003 (1937).
43. P. Liang, erwähnt in 49.
44. E. A. Gorowitsch, *Bull. biol. med. exptl. U.R.S.S.*, **3**, 225 (1937).
45. G. Medes, N. F. Floyd, und S. Weinhouse, *J. Biol. Chem.*, **162**, 1 (1946).
46. K. Bloch und D. Rittenberg, *ibid.*, **155**, 243 (1944).
47. K. A. C. Elliott und M. E. Greig, *Biochem. J.*, **31**, 1021 (1937).
48. A. Kleinzeller, zitiert in H. A. Krebs, in *Advances in Enzymology*, Vol. III. Interscience, New York, 1943, p. 191.
49. H. Wieland und R. G. Jennen, *Ann.*, **548**, 255 (1941).
50. S. Weinhouse, G. Medes, N. F. Floyd, und L. Noda, *J. Biol. Chem.*, **161**, 745 (1945).
51. J. M. Buchanan, W. Sakami, S. Gurin, und D. W. Wilson, *ibid.*, **157**, 747 (1945); **159**, 695 (1945).
52. D. Rittenberg und K. Bloch, *ibid.*, **157**, 749 (1945).
53. N. Hallmann, *Acta Physiol. Scand.*, **2**, Suppl. IV (1940).
54. H. Wieland und R. Sonderhoff, *Ann.*, **503**, 69 (1933).
55. H. Wieland und O. B. Claren, *ibid.*, **492**, 183 (1932).
56. H. Wieland, O. Probst, und M. Crawford, *ibid.*, **536**, 51 (1938).
57. O. L. Mayrhofer, *Diplomarbeit*, München, 1948.

58. S. Ochoa, in D. E. Green, *Currents in Biochemical Research*. Interscience, New York, 1946, p. 165.
59. C. Martius, *Z. physiol. Chem.*, **279**, 96 (1943).
60. C. Long und R. A. Peters, *Biochem. J.*, **33**, 759 (1939).
61. C. Long, *ibid.*, **32**, 1711 (1938).
62. W. Dirscherl, *Z. physiol. Chem.*, **188**, 225 (1930). W. Dirscherl und H. Nahm, *ibid.*, **264**, 41 (1940).
63. Y. Tomiyasu, *Enzymologia*, **3**, 263 (1937).
64. M. Silverman und C. H. Werkman, *J. Biol. Chem.*, **138**, 35 (1941).
65. F. L. Breusch, *Science*, **97**, 490 (1943).
66. F. L. Breusch, *Enzymologia*, **11**, 169 (1944).
67. H. Wieland und C. Rosenthal, *Ann.*, **554**, 241 (1943).
68. F. L. Breusch und H. Keskin, *Enzymologia*, **11**, 243 (1944).
69. S. Weinhouse, G. Medes, und N. F. Floyd, *J. Biol. Chem.*, **166**, 691 (1946).
70. F. E. Hunter und L. F. Leloir, *ibid.*, **159**, 295 (1945).
71. J. M. Buchanan, W. Sakami, und S. Gurin, *ibid.*, **169**, 411 (1947).
72. F. L. Breusch, in *Advances in Enzymology*, Vol. VIII. Interscience, New York, 1948, p. 343.
73. F. Lynen, "Fermente der biologischen Oxydation," *Fiat-Review, Biochemistry*, **3**, 185 (1948).
74. J. M. Buchanan, W. Sakami, S. Gurin, und D. Wilson, *J. Biol. Chem.*, **169**, 403 (1947).
75. A. L. Lehninger, *ibid.*, **143**, 147 (1942).
76. F. Lipmann, *ibid.*, **160**, 173 (1945).
77. G. Embden und A. Loeb, *Z. physiol. Chem.*, **88**, 246 (1913).
78. E. Friedmann, *Biochem. Z.*, **55**, 436 (1913).
79. L. F. Leloir und J. M. Muñoz, *Biochem. J.*, **33**, 734 (1939).
80. J. M. Muñoz und L. F. Leloir, *J. Biol. Chem.*, **147**, 355 (1943).
81. L. F. Leloir und J. M. Muñoz, *ibid.*, **153**, 53 (1944).
82. A. L. Lehninger, *ibid.*, **157**, 363 (1945).
83. A. L. Lehninger, *ibid.*, **161**, 437 (1945).
84. A. L. Lehninger, *ibid.*, **164**, 291 (1946).
85. S. Weinhouse, G. Medes, und N. F. Floyd, *ibid.*, **155**, 143 (1944).
86. G. Medes, S. Weinhouse, und N. F. Floyd, *ibid.*, **157**, 35 (1945).
87. S. Weinhouse, G. Medes, und N. F. Floyd, *ibid.*, **158**, 411 (1945).
88. D. I. Crandall, S. Gurin, und D. W. Wilson, *Fed. Proc.*, **6**, 246 (1947).
89. A. L. Grafflin und D. E. Green, *J. Biol. Chem.*, **176**, 95 (1948).
90. W. E. Knox, B. N. Noyce, und V. H. Auerbach, *ibid.*, **176**, 117 (1948).
91. F. Lipmann, *Enzymologia*, **4**, 65 (1937).
92. F. Lipmann, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, **7**, 248 (1939).
93. F. Lipmann, in *Advances in Enzymology*, Vol. VI. Interscience, New York, 1946, p. 231.
94. S. P. Colowick, H. M. Kalckar, und C. F. Cori, *J. Biol. Chem.* **137**, 343 (1941).
95. V. A. Belitzer und E. T. Tsibakova, *Biokhimiya*, **4**, 516 (1939).
96. S. Ochoa, *J. Biol. Chem.*, **151**, 493 (1943).
97. I. Banga, S. Ochoa, und R. A. Peters, *Biochem. J.*, **33**, 1980 (1939).
98. F. Lynen, *Ann.*, **546**, 120 (1941).
99. F. Lynen und H. Holzer, *ibid.*, **563**, 213 (1949).
100. R. J. Cross, J. V. Taggart, G. A. Covo, und D. E. Green, *J. Biol. Chem.*, **177**, 655 (1949).
101. S. Ochoa, *ibid.*, **138**, 751 (1941).

102. S. Ochoa, *J. Biol. Chem.*, **174**, 115 (1948).
103. F. Lipmann, in *Advances in Enzymology*, Vol. I. Interscience, New York, 1941, p. 99.
104. H. M. Kalckar, *Chem. Revs.*, **28**, 71 (1941).
105. F. Lynen, *Naturwissenschaften*, **30**, 398 (1942).
106. F. E. Hunter, Jr., *J. Biol. Chem.*, **177**, 361 (1949).
107. F. Lynen, *Ber.*, **73**, 367 (1940).
108. C. Martius, *Z. physiol. Chem.*, **257**, 29 (1939).
109. K. P. Jacobsohn und J. Tapadinhas, *Enzymologia*, **5**, 388 (1939).
110. F. L. Breusch, *Z. physiol. Chem.*, **250**, 262 (1937).
111. K. P. Jacobsohn, M. Soares, und J. Tapadinhas, *Bull. soc. chim. biol.*, **22**, 48 (1940).
112. C. Martius und H. Leonhardt, *Z. physiol. Chem.*, **278**, 208 (1943).
113. H. A. Krebs und L. V. Eggleston, *Biochem. J.*, **38**, 430 (1944).
114. J. M. Buchanan und C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.*, **180**, 47 (1949).
115. E. K. Nelson, *J. Am. Chem.-Soc.*, **47**, 568 (1925); **52**, 2928 (1930).
116. F. Bruce, *ibid.*, **57**, 1725 (1935).
117. R. Fittig und H. E. Miller, *Ann.*, **255**, 43 (1889).
118. Literatur, in Beilstein *Handbuch der organischen Chemie*, II. 4 Auflg., Berlin, 1920, p. 849.
119. Terada, *J. Pharm. Soc. Japan*, **511**, 697 (1925).
120. R. Malachowski und M. Maslowski, *Ber.*, **61**, 2521 (1928).
121. J. A. Ambler und F. Y. Roberts, *J. Org. Chem.*, **13**, 399 (1948).
122. W. A. Johnson, *Biochem. J.*, **33**, 1046 (1939).
123. H. A. Krebs und L. V. Eggleston, *ibid.*, **37**, 334 (1943).
124. N. A. Sørensen, *Kgl. Norske Videnskab. Selskabs Forh., Skrifter*, **1937**, Nr. 2.
125. H. Friedrich-Freksa und C. Martius, erscheint in *Z. Naturforsch.*
126. H. A. Krebs, *Biochem. J.*, **36**, ix (1942).
127. H. A. Krebs und L. V. Eggleston, *ibid.*, **42**, 491 (1948).
128. J. R. Stern und S. Ochoa, *J. Biol. Chem.*, **179**, 491 (1949).
129. A. G. Ogston, *Nature*, **162**, 4129 (1948).
130. V. R. Potter und C. Heidelberger, *ibid.*, **164**, 180 (1949).
131. C. Martius und G. Schorre, *unveröffentlicht*.
132. S. Ochoa, *J. Biol. Chem.*, **159**, 243 (1945); **174**, 133 (1948).
133. F. Lynen und H. Scherer, *Ann.*, **560**, 163 (1948).
134. F. Lynen, H. Bayer, und H. Holzer, *ibid.*, **562**, 66 (1949).
135. A. Kornberg, S. Ochoa, und A. H. Mehler, *J. Biol. Chem.*, **174**, 159 (1948).
136. S. Ochoa und E. Weisz-Tabori, *ibid.*, **159**, 245 (1945); **174**, 123 (1948).
137. H. Scherer, *Diplomarbeit*, Universität, München, 1946.
138. B. Vennessland, J. Ceithaml, und M. C. Gollub, *J. Biol. Chem.*, **171**, 445 (1947).
139. A. L. Grafflin und S. Ochoa, *Biochim. et Biophys. Acta*, **4**, 205 (1950).
140. J. Ceithaml und B. Vennessland, *J. Biol. Chem.*, **178**, 133 (1949).
141. E. Adler, H. v. Euler, G. Günther, und M. Plass, *Biochem. J.*, **33**, 1028 (1939).
142. S. Grisolia und B. Vennessland, *J. Biol. Chem.*, **170**, 461 (1947).
143. M. Soodak, und F. Lipmann, *ibid.*, **175**, 999 (1948).
144. A. L. Lehninger und E. P. Kennedy, *J. Biol. Chem.*, **173**, 753 (1948).
145. E. P. Kennedy und A. L. Lehninger, *ibid.*, **179**, 957 (1949).
146. A. L. Lehninger, *ibid.*, **178**, 625 (1949).
147. C. Martius, *Vortrag*, Bonn, 1947; ref. *Angew. Chem.*, **60**, 51 (1948).
148. G. H. Hogeboom, W. C. Schneider, und G. E. Pallade, *J. Biol. Chem.*, **172**, 619 (1948).
149. O. Meyerhof, *Arch. ges. Physiol., Pflügers*, **175**, 20 (1919).

150. M. E. Collett und Mitarb., *J. Biol. Chem.*, **58**, 793 (1924); **82**, 429 (1929); **100**, 271 (1933).
151. F. Bernheim, *Biochem. J.*, **22**, 1178 (1928).
152. G. R. Bartlett und E. S. Barron, *J. Biol. Chem.*, **169**, 67 (1947).
153. G. Kalnitsky und E. S. G. Barron, *ibid.*, **170**, 83 (1947).
154. G. Kalnitsky und E. S. G. Barron, *Arch. Biochem.*, **19**, 75 (1948).
155. C. Liébercq und R. A. Peters, *Biochim. et Biophys. Acta*, **3**, 215 (1949).
156. C. Martius, *Ann.*, **561**, 227 (1949).
157. R. A. Peters, *Nature*, **163**, 914 (1949).
158. R. A. Peters, *ibid.*, **164**, 393 (1949).

NACHTRAG BEI DER KORREKTUR

Wenn somit die "aktivierte" Essigsäure zwar nicht identisch mit Mono-acetylphosphorsäure ist, so besteht doch nahe Verwandtschaft zwischen beiden und es ist möglich, wie Kaplan und Lipmann (159) fanden, durch Ansäuern auf p_H 1.5 und darunter das auf enzymatischem Wege synthetisierte Produkt schon bei Zimmertemperatur nahezu momentan in gewöhnliches Acetylphosphat umzuwandeln.

Was nun die enzymatische Synthese der "aktivierten" Essigsäure aus Acetat und Adenosintriphosphat betrifft, so verdanken wir Nachmansohn und Mitarbeitern (160,161) und vor allem Lipmann und Mitarbeitern (162,163) die Entdeckung, dass hierbei ein neues bisher unbekanntes Coferment beteiligt ist, von Lipmann Coferment A genannt, das sich als Derivat der Pantothenensäure erwiesen hat (164). Es wurde entdeckt beim Studium der enzymatischen Acetylierung von Sulfanilamid oder Cholin, einer dritten Variante des biologischen Essigsäureumsatzes, welche in der Leber bzw. im Nervengewebe angetroffen wird und welche der Synthese von Citronen- und Acetessigsäure an die Seite zu stellen ist; denn auch hier läuft die Synthese über die "aktivierte" Essigsäure (59,93).

Das eingehende Studium der Acetylierungsreaktion war deswegen von vornherein besonders begünstigt, weil es gelang die Enzyme von der Zellstruktur abzutrennen und in Lösung zu bringen (76,165). Damit war die Voraussetzung gegeben, die spezifischen Proteine anzureichern und sie vor allem von den niedrigmolekularen Komponenten zu befreien, die sie im komplexen System der Zelle und auch noch in den isolierten Strukturelementen wie etwa den Mitochondrien begleiten. Wird die Lösung der spezifischen Proteine aus Taubenleber, nach Fraktionierung des rohen Gewebsextraktes mit Ammonsulfat gewonnen, nachträglich wieder mit Adenosintriphosphat, Magnesiumionen und Coferment A ergänzt, dann kommt nach Zugabe von Acetat und Sulfanilamid die Synthese des acetylierten Amins zustande.

Neuerdings gelang es Soodak und Lipmann (166) mit Hilfe derselben Enzymlösung aus Taubenleber auch die Synthese der Acetessigsäure aus zwei Molekeln Essigsäure zu verwirklichen und schliesslich Stern und Ochoa (128) auch die der Citronensäure aus Essigsäure und Oxalessigsäure. Wie aus Tab. 11 hervorgeht, welche die experimentellen Befunde von Soodak und Lipmann sowie von Stern und Ochoa wiedergibt, kommen diese Synthesen nur in Gegenwart von Coenzym A zustande. Damit findet eine Beobachtung von Novelli und Lipmann (167) ihre Bestätigung, wonach pantothenensäure-arme Hefe die Fähigkeit zur Oxydation von Essigsäure weitgehend verloren hat, aber sie beim Bebrüten mit Pantothenensäure und Glucose über eine Neubildung von Coferment A wieder zurückerhält. Auch Novelli und Lipmann vermuteten schon, dass dieses Coferment bei der Kondensation von Essigsäure und Oxalessigsäure beteiligt sei.

TABELLE 11

SYNTHESE VON ACETESSIGSÄURE MITTELS ENZYMLÖSUNG AUS TAUBENLEBER

Zusätze:	0.02 m-Acetat 0.01 m-ATP 120 Einh. Coferment A	0.02 m-Acetat 0.01 m-ATP —	0.02 m-Acetat — 120 Einh. Coferment A	— 0.01 m-ATP 120 Einh. Coferment A
Mole Acetessigsäure gebildet:	3.2	0.1	0.2	0.3

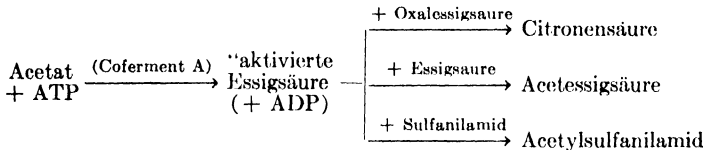
1 ml gereinigte Enzymlösung (entsprechend 180 mg Acetonleber) in 3 ml Lösung, die 0.01 m-Cystein, 0.1 m-NaHCO₃ enthält; 2 Stnd. bei 38° bebrütet.

SYNTHESE VON CITRONENSÄURE AUS ESSIGSÄURE UND OXALESSIGSÄURE MITTELS ENZYMLÖSUNG AUS TAUBENLEBER (128)

Mole Citronensäure gebildet:					
Vollständiges System	ohne Coferment A	ohne ATP	ohne Mg ⁺⁺	ohne Oxalacetat	ohne Acetat
0.86; 1.26	0.06	0.09	0.57	0	0.05

1 ml des vollständigen Systemes enthält: Enzym (12-15 mg Protein) in 0.02 m-NaHCO₃; 0.4 ml 0.025 m-Kaliumphosphat p_H 7.0; 2.25 5 Einheiten Coferment A; 17 μMole Oxalacetat; 20 μMole Acetat; 3 μMole ATP; 4 μMole MgCl₂; 10 μMole l-Cystein. 60 Minuten bei 25° unter 5% CO₂-95% N₂ bebrütet.

Im übrigen machten Ochoa und Stern die Beobachtung, dass durch Oxalacetat sowohl die Synthese von Acetessigsäure wie auch die Acetylierung von Sulfanilamid zurückgedrängt wird. Ein Beweis, dass den drei Reaktionen ein Zwischenprodukt, eben jene "aktivierte" Essigsäure gemeinsam ist.



Es wird die Aufgabe künftiger Untersuchungen sein, die Wirkungsweise des Cofermentes A und im Zusammenhang damit die Struktur dieses Phosphorsäurederivates aufzuklären.

Literatur

159. N. O. Kaplan und F. Lipmann, *J. Biol. Chem.*, **176**, 459 (1948).
160. D. Nachmansohn und H. M. John, *ibid.*, **158**, 157 (1945).
161. D. Nachmansohn und M. Berman, *ibid.*, **165**, 551 (1946).
162. F. Lipmann und N. O. Kaplan, *ibid.*, **162**, 743 (1946).
163. F. Lipmann und N. O. Kaplan, *Federation Proc.*, **5**, 144 (1946).
164. F. Lipmann, N. O. Kaplan, G. D. Novelli, L. C. Tuttle, und B. M. Guirard, *J. Biol. Chem.*, **167**, 869 (1947).
165. D. Nachmansohn und A. L. Machado, *J. Neurophysiol.*, **6**, 397 (1943).
166. M. Soodak und F. Lipmann, *J. Biol. Chem.*, **175**, 999 (1948).
167. G. D. Novelli und F. Lipmann, *ibid.*, **171**, 833 (1947).

DIE PHYTOCHEMIE DES SCHWEFELS

Von THEODOR BERSIN, *Marburg/Lahn, Germany**

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung	223
I. Elementarer Schwefel, Sulfate, und Polythionsäuren	229
II. Schwefelwasserstoff	232
III. Schwefelsäureester, Sulfosäuren, Sulfit, Thioäther, Sulfoxyde, Thioaldehyde	234
A. Schwefelsäureester	234
B. Sulfonsäuren	236
C. Sulfit	236
D. Thioäther	238
E. Stickstofffreie alicyclische Disulfide und Sulfoxyde	257
F. Thioaldehyde	259
IV. Thioharnstoffe und Senföle	260
A. Thioharnstoffe	260
B. Senföle	262
V. Die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin, Cystathionin, Cystein, und Cystin	268
VI. Schwefelhaltige Peptide und Proteine	284
A. Schwefelhaltige Polypeptide	288
B. Schwefelhaltige Proteine	297
VII. Am Schwefelstoffwechsel beteiligte Enzyme	306
A. Schwefelspezifische Redoxasen	306
B. Sulfatasen	310
Literatur	311

Einleitung

Unsere Kenntnisse über den Gesamtumsatz der Schwefelkörper in der Pflanze sind recht lückenhaft. Erst in den letzten Jahren ist etwas mehr Licht in dieses Dunkel gefallen. Es zeigte sich, dass die zu anaerober Lebensweise neigenden Organismen (z.B. Hefe) oder Organe reicher an Neutralschwefel (RSH, R—S—Alkyl, RSSR) sind, als die streng aeroben (Laubblätter), in denen in der Fraktion des Nichteisenschwefels die Schwefelsäure überwiegt. Bei der bilanzmässigen Erfassung der Verhältnisse zeigte es sich, dass es ganz allgemein im pflanzlichen Stoffwechsel nicht allein eine Reduktion der Sulfate, sondern ebenso wie im Tierreich auch eine Rückoxydation

* Zum 70. Geburtstag von Carl Neuberg.

des 2-wertigen Schwefels zu Sulfaten gibt. Die Schwefelsäure ist also Anfangs- und Endprodukt des Schwefelumsatzes (Mothes).

Die Reduktion der Schwefelsäure erfolgt nicht nur bei Sauerstoffmangel, sondern auch in ausgesprochener Oxybiose, dann aber sehr langsam, gewissermassen im Tempo des Verbrauchs von Schwefel zur Eiweiss-synthese. Diese oxybiontische Sulfatreduktion geht nur bei genügendem Kohlenhydratvorrat vor sich. Sie führt nicht zur Vermehrung des Neutralschwefels und vor allem nicht zur Anhäufung von Thiolgruppen. Sowohl bei Hefe als auch bei Laubblättern wurde beobachtet, dass bei grösserem Vorrat an Neutralschwefel und für die Proteinsynthese günstigen Bedingungen nicht allein diese abläuft, sondern gleichzeitig Sulfat gebildet wird. Reifende Bohnensamen enthalten nur Spuren von Neutralschwefel, in den Schalen überwiegt die Schwefelsäure, in den Nährgeweben des Embryos der Eiweiss-Schwefel, welcher auf Kosten der Schwefelsäure abnimmt. In den meisten Fällen weisen die höheren Pflanzen einen weit grösseren Gehalt an Sulfat auf, als sie zum Leben nötig haben, auf der anderen Seite leben die Blätter noch und machen einen gesunden Eindruck, wenn sie fast frei von Sulfaten sind.

Wie verhalten sich aber die Pflanzen wenn sie eine nur mangelhafte Zufuhr von Sulfaten erhalten? Verschiedene Veröffentlichungen stimmen darin überein, dass schwere Ausfallserscheinungen die Folge sind. So zeigen Sonnenblumenpflanzen bei Ersatz von $MgSO_4$ durch $MgCl_2$ in der Kulturlösung kleinere gelbgrüne Blätter, dünnere Stämme, und eine auffällige Stammverlängerung, in den Pflanzen wird eine ausgeprägte Proteolyse beobachtet und lösliche organische Stickstoffverbindungen, sowie Nitrate werden in höherem Masse, als bei den Kontrollen gespeichert (Eaton). Die bei Mais beobachtete Chlorose zeigt, dass der Schwefel auch zur Chlorophyllbildung und zwar augenscheinlich zur Synthese des Proteinträgers notwendig ist. Durch Schwefelmangel wird die lebende Zelle unfähig, die organischen Träger, welche die biochemischen Wirkungen der Mineralstoffe regeln, aufzubauen (Mazé).

Tomatenpflanzen reagieren nach Nightingale, Schermerhorn, und Robbins auf Schwefelmangel mit einer Verlängerung der Stengel, einem vermindertem Dickenwachstum und einer Verdickung der Zellwände. Bei verminderter Nitratreduktion und verlangsamtem Kohlenhydratabbau zeigt sich eine Steigerung des Gehalts an Kohlenhydraten und Nitraten. Einer Verminderung des Gehalts an Thiol-

schwefel steht das praktische Fehlen eines aktiven Kambiums gegenüber. Der Gesamtschwefelgehalt der schwefelfrei ernährten Pflanzen ist nicht viel geringer als derjenige der Kontrollen, doch ist der Hauptteil wasserlöslich, während normal ernährte Pflanzen den Schwefel meist komplex gebunden enthalten. In den schwefelfrei ernährten Pflanzen finden sich nur Spuren Cystein, Cystin, und Glutathion. Das aufgenommene Sulfat wird von den Tomatenpflanzen im Phloem der Wurzeln und Sprosse zu Sulfit und Thiol reduziert.

Der Schwefelbedarf der Kulturpflanzen entspricht der Grössenordnung nach dem Phosphorbedarf, bei regelmässiger Stallmistzufuhr und Düngung mit sulfathaltigen Mineraldüngern ist eine pflanzenschädigende Verarmung an aufnehmbaren Sulfaten nicht zu befürchten (Balks).

Bei *Chilomonas Paramecium* führt das Weglassen von Sulfat in der Nährflüssigkeit zu einer ausserordentlichen Zunahme des Fettgehaltes und einer allmählich einsetzenden Atmungsminderung (Mast, Pace, und Mast).

Ein bezeichnender Befund über die Bedeutung schwefelhaltiger Verbindungen für das Wachstum von niederen Pflanzen wurde von Harvey erhoben. Er fand, dass eine Diatomee, *Ditylum brightwelli*, für ein kräftiges Wachstum in künstlichem Meerwasser neben Manganspuren und anorganischen Salzen Alanin oder Milchsäure einerseits und organische Schwefelverbindungen, welche die Gruppierung $-\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ aufweisen, andererseits benötigt.

Bekannt ist ferner, dass alle Corynebakterien, die Traubenzucker vergären und als echte *Diphtheriebakterien* anzusehen sind, einen Cystinbedarf aufweisen (Gross).

Dagegen hat sich gezeigt, dass *Aspergillus niger* beim Wachstum auf anorganischem Nährboden unter Zusatz von leicht assimilierbaren Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glykokoll, Oxyprolin, Ornithin, und Prolin) von Cystein gehemmt wird (Steinberg). Möglicherweise handelt es sich hier aber nur um eine Frage des Redoxpotentials. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass *Pneumokokken* auf Zusatz von Thioglykolsäure mit gutem Wachstum reagieren (Rane und Subbarrow). Nun ist zwar Thioglykolsäure eine in der Natur nicht vorkommende Verbindung, aber als Thiol drückt es dem Medium ein stark negatives Redoxpotential auf, das die *Pneumokokken* zum Wachstum benötigen.

Ähnliche Beobachtungen sind auch am *Bacterium bifidum* gemacht

worden. Unter den Darmbewohnern nimmt dieses Bacterium eine auffällige Sonderstellung ein. Eine Züchtung auf Platten gelingt nur nach Zusatz von Cystin. Zwar sind frische Oberflächenkulturen auf cystinhaltigen Milchzuckeragarplatten immer empfindlich gegenüber dem Sauerstoff der Luft, aber wie viele Anaerobier verträgt der Bifidus eine völlige Abwesenheit von Sauerstoff nicht. Er bedarf lediglich einer Verminderung der Sauerstoffspannung. In reiner Wasserstoffatmosphäre gedeiht er bemerkenswerterweise nicht (Blau-rock). Es wird Aufgabe der zukünftigen Forschung sein, optimale Redoxpotentiale für das Wachstum der Anaerobier festzustellen.

Die eigentlichen lebenswichtigen Schwefelverbindungen sind die Thiole und Disulfide in Form der Proteine, des Glutathions und Cysteins.

Die Rückoxydation zu Sulfat erfordert die Bereitstellung von *löslichen* niedrigmolekularen Derivaten des 2-wertigen Schwefels, denn Proteinschwefel lässt sich ohne vorherige Mobilisation nicht oxydieren. Mothes konnte zeigen, dass die Oxydation der Thiole recht allgemein schnell über die Disulfidstufe und andere Zwischenverbindungen zum Sulfat fortschreitet. Das ist wohl eine der Hauptursachen dafür, dass überschüssige Schwefelmengen nicht als Neutralschwefel, sondern als Sulfat liegen bleiben, welches das Anfangs- und Endprodukt des pflanzlichen Schwefelstoffwechsels ist. Werden der Pflanze Verbindungen des 2-wertigen Schwefels (Cystein oder Thioglucose) angeboten (Vakuuminfiltration) oder wird durch ein Hungerversuch eine Proteolyse und damit eine Bereitstellung von Sulfidschwefel erzwungen, so erfolgt eine *rapide* Umwandlung der Sulfide zu Sulfat falls Sauerstoff da ist und die entsprechenden Redoxasen funktionieren. Die gebildete Schwefelsäure wird durch Salzbildung mit den Puffersubstanzen unschädlich gemacht.

Schwefelsäureester sind in den Organen höherer Pflanzen relativ selten, treten jedenfalls gegenüber der anorganischen Schwefelsäure zurück. Es ist wahrscheinlich, dass die Oxydation der organischen Sulfide über die Ester verläuft und dass andererseits Schwefelsäureester als Zwischenprodukte bei der Reduktion des 6-wertigen zum 2-wertigen Schwefel auftreten. In Gegenwart von Sauerstoff wurde zugesetzte Schwefelsäure von Hefe z.B. nicht in Ester überführt. Bemerkenswert ist die Beobachtung von Specht, wonach aus Hefekulturen der *Thiosulfatester einer Aminohexose* sowie *Methylsulfonsäure*

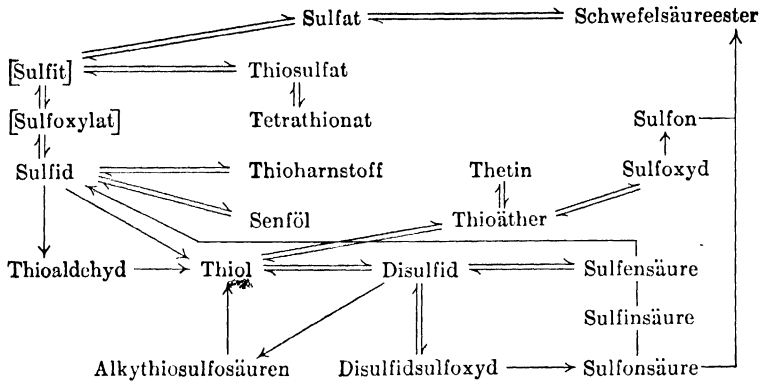
isoliert werden können. Die Auffindung des Hexoesters erscheint nach Mothes deshalb bedeutungsvoll, weil in Algen Schwefelsäureester als Membranstoffe eine normale Erscheinung sind. Für die Hefe haben die Ester mengenmässige und also regelmässige Baustoffe wohl nur eine geringe Bedeutung. Alkalisches Medium hemmt bei der Hefe die Esterbildung.

In den Leitungsbahnen höherer Pflanzen (*Phaseolus*, *Vicia*, *Phytolacca*, *Atropa*) findet man neben geringen Mengen von Eiweisschwefel absolut und relativ ausserordentlich hohe Schwefelsäurewerte (Sulfate + Ester). Man könnte also in der Schwefelsäure und ihren Estern die eigentliche Wanderform des Schwefels sehen.

Was den *Eiweisschwefel* anbelangt, so zeigt sich, dass Kohlenstoffhungern und Anaerobiose zum Schwund führen und zwar in schwach saurem Medium schneller als in alkalischem (Hefe). Die Thiole werden trotz O₂-Mangel dehydriert, z.T. bis zum Sulfat, wenn auch mit sehr geringer Geschwindigkeit und niemals quantitativ. Der Stoffwechsel der Schwefelverbindungen hat in den letzten Jahren dadurch ein besonderes Interesse erweckt, als gezeigt werden konnte, dass Thiole und Disulfide zu den wichtigsten Effektoren (Bersin) der Enzyme gehören. Hier spielt gerade der Eiweisschwefel eine grosse Rolle. Denn von der Gegenwart oder Abwesenheit von HS-Gruppen in den Molekülen gewisser Proteofermente (Urease, Papain u.a.) hängt entscheidend ihre abbauende oder synthetisierende Tätigkeit ab. Der leichte Übergang vom Thiol zum Disulfid und umgekehrt ist abhängig vom Redoxpotential und der Anwesenheit von Hilfskatalysatoren (Glutathion) bzw. Redoxasen im Verein mit H-Donatoren sowie H-Acceptoren.

In den letzten Jahren sind noch 3 wichtige Stoffe bzw. Stoffgruppen aus der Reihe der schwefelhaltigen Pflanzenbestandteile in das Rampenlicht der Öffentlichkeit getreten. Es sind das die Biotine, die Penicilline und das Aneurin bzw. Cocarboxylase. Ihre Berücksichtigung unter dem Gesichtswinkel der Bedeutung für die Pflanze selbst erheischt eine sorgfältige Sichtung des Schrifttums, das sich ja vorzüglich mit dem Nutzen dieser Verbindungen für den kranken Menschen befasst.

Der phytochemische Kreislauf des Schwefels lässt sich schematisch wie folgt darstellen:



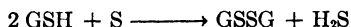
Der Sulfatschwefel wird von Mikroorganismen und grünen Pflanzen aufgenommen und entweder in Schwefelsäureester verwandelt oder zu Sulfid reduziert, wobei es vom *pH* abhängt, ob dabei freier Schwefelwasserstoff auftritt. Ob bei der Reduktion zu Sulfid die Stufen des Sulfits und Sulfoxylats durchlaufen werden, ist noch nicht gesichert. Der Sulfidschwefel wird im Licht meistens sofort zu Schwefelsäure oxydiert (im gut durchlüfteten Erdboden ist z.B. Schwefelwasserstoff nicht nachweisbar) oder in organische Bindung übergeführt. Nur selten kommt es zu einer Anhäufung, wie im Schwarzen Meer. Gewisse Mikroorganismen vermögen Thioschwefelsäureester zu bilden, während andere wieder Thiosulfat und Tetrathionat mit Hilfe ihrer Fermente und Cofermente verarbeiten. Die Hauptmenge des in den Pflanzen gebildeten zweiwertigen Schwefels tritt in organischer Bindung als Thiol oder Disulfid, in speziellen Fällen als Thioharnstoff oder Isothiocyanat auf. Die meist dem Proteinstoffwechsel entstammenden Thiole können weiter zu Thioäthern umgesetzt werden, deren Oxydation über Sulfoxyd und Sulfon (vielleicht auch noch über Sulfonsäuren und Schwefelsäureester) zu Sulfat zurückführt. Die durch Dehydrierung der Thiole gebildeten symmetrischen oder unsymmetrischen Disulfide werden durch milde Oxydation in Disulfidsulfoxyd verwandelt, energische Oxydation führt über Sulfonsäuren wiederum zu Sulfat. Hydrolyse der Disulfide gibt Thiole und Sulfensäuren, welche entweder Schwefelwasserstoff abgeben oder weiter über Sulfonsäuren zu Sulfat oxydiert werden. Je nach dem Redoxpotential und dem *pH*, das in der Zelle herrscht, können aus vorliegenden Schwefelverbindungen bei gleicher Fermentausrüstung

die verschiedensten Reaktionsprodukte entstehen. Die nicht eingeklammerten Verbindungen des obigen Schemas, welche im Nachstehenden noch eingehend besprochen werden, sind bisher alle als Stoffwechselprodukte von Pflanzen aufgefunden worden.

Natürlich kommen manche der eben geschilderten Reaktionen nur bei bestimmten Pflanzen vor, etwa die Senfölbildung oder die Penicillinproduktion. Weiter kann es sein, dass in Zukunft Vorgänge, welche uns heute einheitlich erscheinen, aufgelöst werden müssen in Teilvorgänge mit verschiedenen beteiligten Fermenten. Die nur in Geringstmengen gebildeten schwefelhaltigen Wirkstoffe, etwa die Thioäther Biotin und Aneurin, ermöglichen anderen Lebewesen, Symbionten und Parasiten der Erzeuger, die Existenz. Kampfstoffe wie das Penicillin gestatten es den erzeugenden Organismen ihre Umgebung von Nährstoffkonkurrenten frei zu halten. Ohne die von den Pflanzen erzeugten schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin ist ein Leben der Tierwelt undenkbar. Die Wirkung der von den Mikroorganismen erzeugten Schwefelsäure kann in geologischen Zeiträumen zu recht bedcutsamen Vorgängen führen; die bekannten Ausblühungen an senkrechten Felswänden bestehen überwiegend aus Sulfaten der aus dem Boden herausgelösten Kationen. So kann die Oxydation des Schwefels der Humusstoffe und des Pyrits im Boden zu einem wichtigen Faktor in der Gesteinsverwitterung werden.

I. ELEMENTARER SCHWEFEL, SULFATE, POLYTHIONSÄUREN

Der elementare Schwefel findet sich als solcher nicht im lebenden pflanzlichen Gewebe. Lediglich manche Bakterien und Pilze vermögen Polysulfidschwefel zu speichern (s.u.). Aber an Lagerstätten und bei der Verwendung von Schwefel zur Schädlingsbekämpfung kommen verschiedene Pflanzen damit in Kontakt. Es kommt dann infolge der oxydoreduktiven Umsetzung des Schwefels mit Thiolverbindungen der Pflanze, etwa Glutathion, nach:



zur Schwefelwasserstoffbildung (Hefe) bzw. der Schwefel wird zu Sulfit, Thiosulfat, Tetrathionat und Sulfat oxydiert und die höheren Pflanzen haben sich mit diesen mikrobiell entstandenen Oxydationsprodukten des Schwefels enzymatisch auseinanderzusetzen.

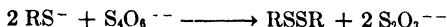
Auf die Möglichkeit der Zwischenbildung unbeständiger Additionsverbindungen von Thiolen mit Sauerstoff und Schwefel haben E. C. Kendall und F. F. Nord, *J. Biol. Chem.*, **69**, 295 (1926), und F. F. Nord, *J. Phys. Chem.*, **31**, 867 (1927), hingewiesen.

In dem Masse, wie aus Schwefel und HS-Glutathion Schwefelwasserstoff und SS-Glutathion gebildet wird, vermögen Redoxasen das GSSG mittels des von Kohlenhydratstoffwechselprodukten gelieferten Wasserstoffs wieder zu reduzieren; es ist bekannt, dass die phytochemische Schwefelhydrierung thermolabil ist, also einen enzymatischen Prozess darstellt. Das Glutathion spielt die Rolle eines Hilfskatalysators, wofür schon die Versuche von Meldrum und Tarr sprachen, welche die Reduktion von GSSG durch Hexosemonophosphat in Gegenwart eines Pyridinenzym aus Hefe beobachtet hatten. Allerdings wird wohl ein Teil des SS-Glutathions über Sulfoxyd, Sulfit und Thiosulfat schliesslich zu Sulfat oxydiert, denn bei der durch Hefe bewirkten Schwefelhydrierung tritt gleichzeitig Sulfat auf und es entstehen organische Schwefelverbindungen. Es ist denkbar, dass die Enzymsysteme, welche bei der Atmung die Uebertragung der Elektronen auf den Sauerstoff vermitteln, auch gewisse Teilreaktionen desjenigen Vorganges zu katalysieren vermögen, durch welchen der Schwefel hydriert wird. So hydriert die stark atmende Bäcker-(Ober-)Hefe kolloidalen Schwefel viel intensiver, als die schwach atmende Brauerei-(Unter-)Hefe, wie v. Euler und Mitarbeiter gezeigt haben. Die Hydrierungsenergie wird dem Atmungsvorgang entnommen.

Elementarer Schwefel kann übrigens nur in direkter Berührung mit den Bakterien, etwa *Thiobacillus thiooxydans*, oxydiert werden (Vogler und Umbreit). *Thiobacillus denitrificans* denitrifiziert unter Verwendung von elementarem Schwefel als Sauerstoffakzeptor, der dabei zu Schwefelsäure oxydiert wird (Rippel-Baldes).

Schon lange ist ferner bekannt, dass Mikroorganismen den Schwefel der Eiweisstoffe in Schwefelwasserstoff bzw. aliphatische Mercaptane zu verwandeln vermögen. Ein tieferer Einblick in diese enzymatischen Vorgänge ist bis heute noch nicht recht gelungen, doch haben Untersuchungen der letzten Jahre beachtliche Fortschritte gebracht, weil das Interesse am Studium der schwefelhaltigen Proteinbausteine erheblich zugenommen hat (s.u.).

Im Zusammenhang mit der bekannten Tatsache, wonach *in vitro* Tetrathionat Thiole rasch zu Disulfiden unter Bildung von Thiosulfat oxydiert (Philips, Gilman, Koelle, und Allen):



ist es beachtlich, dass Mikroorganismen der *Salmonella*-Gruppe rasch Tetrathionat zu Thiosulfat reduzieren (Knox, Gell, und Pollock); offenbar spielt hier das HS-Glutathion die Rolle eines Wasserstoff- oder besser Elektronenüberträgers. Die eigentlichen Lieferanten der Elektronen sind wahrscheinlich Abbauprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels. Darauf wird bei der Besprechung der Rolle des Glutathions noch einzugehen sein.

Thiosulfat kann mikrobiologisch verändert werden. So oxydieren farblose *Schwefelbakterien* (s.u.) Thiosulfat zu Sulfat und Tetrathionat.

In diesem Zusammenhang sei auf die Umsetzung von Thiosulfat mit Kupfersulfat hingewiesen:



wobei unter Reduktion des zweiwertigen zum einwertigen Kupfer und Bildung von Tetrathionat Sulfat entsteht. Nach dieser Reaktion kann Tetrathionat präparativ hergestellt werden (Preuss), das zur Anreicherung von Typhusbakterien in Stuhlproben verwandt wird, da es das Wachstum von Colibakterien fast völlig unterdrückt.

Für höhere Pflanzen erweist sich Thiosulfat schädlich. Nach Audus und Quastel zeigen weder Dithionat noch Trithionat eine so grosse toxische Wirkung auf das Wurzelwachstum, wie Thiosulfat. Verschiedene Pflanzen sind von unterschiedlicher Empfindlichkeit. Die folgende Reihe zeigt abnehmende Empfindlichkeit (4 bis 41 M/1000 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zwecks Erzielung einer 50%igen Hemmung): Gartenerbse, Kresse, Kohl, Raps, Mais, Flachs, Rettich, Senf, Karotte.

Im Hinblick auf die von Boas mitgeteilte Hemmungswirkung der Rhodanide auf gewisse Bakterien (vgl. Rippel-Baldes), sei darauf hingewiesen, dass gewisse Bodenmikroorganismen sogar auf Ammoniumrhodanid als alleiniger Nahrungsquelle zu leben vermögen (Sandhoff und Skinner).

Ueber die Reduktion der Sulfate in höheren Pflanzen war oben schon die Rede. Es sei noch auf die mikrobielle Reduktion zu Sulfid eingegangen.

Die Hauptquelle der Schwefelwasserstoff-Bildung in der Natur ist nach Rippel-Baldes die Desulfurikation. Man versteht darunter die Dehydrierung organischer Stoffe mittels des Sulfatsauerstoffs durch Redoxasen von Mikroorganismen. Die Sulfate werden dabei über

z.T. noch unbekannte Zwischenstoffe zu Schwefelwasserstoff reduziert. Quantitativ tritt gegenüber diesem Vorgang die aus Eiweiss erfolgende Bildung von H_2S (Spaltung von Sulfensäure in Aldehyd und Schwefelwasserstoff, s.u.) zurück. Bei den Desulfurikanten ist diese Stoffwechselform obligatorisch. Der Hauptvertreter ist *Vibrio (Sporovibrio) desulfuricans*, ein Anaerobier, der Zucker, organische Säuren, Fette, Harze, Harzsäuren u.a. angreift. Auch der holzzerstörende Pilz *Schizophyllum commune* (s.u.) vermag augenscheinlich Sulfat zu Sulfid zu reduzieren.

In der Natur kann der Schwefelwasserstoff nur an anaeroben Standorten, vornehmlich in Gewässern, eine grössere Konzentration erreichen. Bei Vorhandensein von Eisenverbindungen kommt es dabei zur Ausfällung von schwarzem Eisensulfid, wie es für den Schlamm in stagnierendem Süsswasser und auch in abgeschlossenen Meeresteilen (schwarzer Heilschlamm der Limane) charakteristisch ist.* Im Schwarzen Meer beträgt der Gehalt an zweifellos enzymatisch gebildetem H_2S in einer Tiefe von 2528 Metern 6.55 ml. im Liter. In solcher Umgebung ist höheres Leben nicht möglich, worauf etwa schon das Fehlen des Aals im Donauebiet hinweist.

II. SCHWEFELWASSERSTOFF

An verschiedenen Orten der Erde findet man wie gesagt Quellen und Gewässer, die aus anorganischen Sulfaten gebildeten Schwefelwasserstoff enthalten. Hier können fast keine höheren oder niederen Pflanzen gedeihen, da H_2S als Paralytiker und Destruktor lebenswichtiger Redoxasen meist schon in geringer Konzentration ein starkes Gift darstellt (über die H_2S -bildenden Pilze und Bakterien s.u.).

Und doch findet man in den nach faulen Eiern riechenden Gewässern eine eigenartige Vegetation. Eine farblose Bakterienart *Beggiatoa* (Janke) nutzt beispielsweise die Oxydation des Schwefelwasserstoffs zu Schwefel oder besser Wasserstoffpersulfid H_2S_x (von Deines) zwecks Gewinnung von Betriebsenergie ebenso aus, wie es die nitrifizierenden Bakterien tun, denen die Dehydrierung organischer Substrate zur Reduktion des molekularen Stickstoffes dient.

Am bekanntesten sind die Schwefelbakterien des Schwarzen Meeres, die in einer Tiefe von etwa 200 Meter (vgl. Karaoglanov) eine

* Nach C. Neuberg und I. Mandl, *Arch. Biochem.*, 19, 149 (1948), werden Sulfide von Bioelementen durch Aminosäuren und Peptide komplex in Lösung gehalten; möglicherweise spielen diese Komplexe bei der Heilwirkung eine Rolle.

Zone bilden, die die untere mit H_2S gesättigte Schicht von der oberen H_2S -freien trennt. Hier handelt es sich um anaerobe *Spirillen*. Alle diese *farblosen* Schwefelbakterien vertragen nur eine mässige H_2S -Konzentration. Ihre Enzymsysteme sind kaum erforscht.

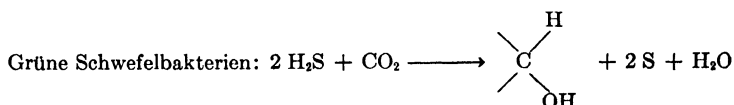
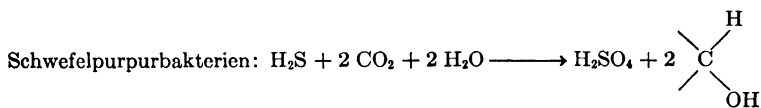
Eine Sonderstellung nehmen die *farbstoffhaltigen* Schwefelbakterien ein, die sich als phototroph erwiesen. Sie nutzen also ebenso wie die grünen Pflanzen die Energie des Sonnenlichtes zu synthetischen Reaktionen aus.

Sehr interessant liegen die Verhältnisse bei den *Schwefelpurpurbakterien*, die von van Niel eingehend untersucht worden sind. Es gelang ihm, völlig reine Kulturen dieser Einzeller auf rein mineralischen Nährböden zu züchten. In gleicher Weise konnten auch die bacteriochlorophyllhaltigen *grünen Schwefelbakterien* kultiviert werden.

Schon Engelmann hatte 1583 darauf hingewiesen, dass die *Schwefelpurpurbakterien* Kohlensäure unter Abspaltung von Sauerstoff photosynthetisch zu assimilieren vermögen. Van Niel konnte dann zeigen, dass diese Photosynthese eine Oxydoreduktion darstellt, wie schon Klyver und Donker vermutet hatten.

Während aber die *grünen Schwefelbakterien* den als H-Donator verwandten *Schwefelwasserstoff* nur bis zum elementaren *Schwefel* (bzw. Polyschwefelwasserstoff) oxydieren, vermögen die *Schwefelpurpurbakterien* die Oxydation bis zum *Sulfat* durchzuführen. In Übereinstimmung hiermit kommt bei den ersteren auf zwei Moleküle oxydierten Schwefelwasserstoff ein Molekül reduzierter Kohlensäure, während bei den *Schwefelpurpurbakterien* jedem Molekül oxydierten Schwefelwasserstoffs zwei Moleküle reduzierter Kohlensäure entsprechen.

Schematisch kann der Prozess bei den beiden Arten von Schwefelbakterien wie folgt formuliert werden:



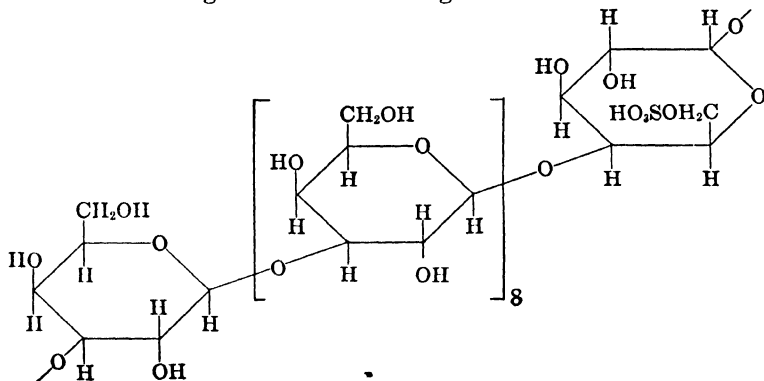
Die Entwicklung dieser Bakterien ist gebunden an eine bestimmte Wasserstoffionenkonzentration und an ein bestimmtes Redoxpotential. Die Enzyme, welche die obigen Umsetzungen bewirken, sind nur sehr mangelhaft erforscht (vgl. Kapitel 8).

III. SCHWEFELSÄUREESTER, SULFOSÄUREN, SULFIT, THIOÄTHER, SULFOXYDE, THIOALDEHYDE

A. Schwefelsäureester

Als Membranstoffe von Algen sind Schwefelsäureester verschiedentlich nachgewiesen worden und in der Hefe sind sie, wenn auch nur in kleinen Mengen, ständig zu finden. Das Mycel von *Aspergillus sydowi* reichert nach Woolley und Peterson einen Cholin-schwefelsäureester $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\cdot\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\cdot\text{SO}_3^-$ an. Ein Polysaccharid-schwefelsäureester hat wegen seiner Fähigkeit zur Bildung homogener Gallerten seit Jahrzehnten Anwendung zur Herstellung von Nährböden gefunden: der Agar.

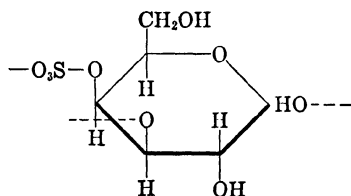
Agar-Agar. Der Agar kommt in verschiedenen Rotalgen und Tangen vor, z.B. *Gigartina spinosa*, *Gelidium corneum*, *Spiridia filamentosa* (vgl. Cioglia), *Phyllophora nervosa* (vgl. Korenzwit). Der in China, Japan, und der UdSSR gewonnene Stoff liefert bei der Hydrolyse mit Säuren neben Schwefelsäure Galactose, stellt also einen Polygalactosidschwefelsäureester dar. Wie die eingehenden Untersuchungen von Jones und Peat gezeigt haben, besteht die Ketteneinheit wahrscheinlich aus 9 D-Galactopyranose-Resten, welche wechselseitig durch 1,3-Glycosid-Bindungen verknüpft sind. Diese Kette wird am reduzierenden Ende durch einen L-Galactopyranose-Rest an C₄ abgeschlossen. Die primäre Alkoholgruppe (C₆) jedes L-Galactose-Restes ist mit Schwefelsäure verestert, so dass sich im Ganzen folgendes Formelbild ergibt:



Es ist anzunehmen, dass D-Galactose-1-sulfat, welches durch eine intramolekulare Oxydoreduktion in L-Galactose-6-sulfat übergehen kann, eine ähnliche Funktion in der Biosynthese des Agars erfüllt, wie das Glucose-1-phosphat bei der enzymatischen Stärkesynthese. Eine der Phosphorylase entsprechende Sulfonylase bleibt noch zu entdecken. Bemerkenswerterweise enthält der Agar aus der russischen Schwarzmeer-Phyllophore doppelt so viel Sulfatreste, als der japanische (Opotzki und Bortnik). Zweifellos spielt der Agar als Kationenaustauscher (vgl. Bersin) in den Membranen der Algen eine bedeutsame Rolle.

Ueber agarabbauende Bakterien der kalifornischen Küste, die augenscheinlich ein der Amylase oder Phosphorylase entsprechendes Enzym besitzen, berichtet Stanier. Während Wieringa eine in Stalldünger, Kompost, und Humus vorkommende Spezies beschreibt.

Weitere Schwefelsäureester finden sich in dem Carrageenschleim. Der wasserlösliche Polysaccharidschwefelsäureester aus der Rotalge *Gigartina stellata* ähnelt demjenigen aus *Chondrus crispus*. Von Dewar und Percival wurde aus der ersteren durch Extraktion mit heissem Wasser und Fällung mit Alkohol ein Salz isoliert, $[\alpha]_D^{15} = 51^\circ$, welches neben 23.9% SO_4 noch 3.6% Ca, 1.0% Mg, 0.2% Na, und 0.1% K enthält. Aus diesem Salz konnte eine Säure dargestellt werden, $[\alpha]_D^{19} = 43^\circ$, die verhältnismässig stabil gegen Alkali war und bei der Hydrolyse mittels Oxalsäure lediglich D-Galactose lieferte. Es liegt augenscheinlich ein Polygalactosidoschwefelsäureester folgender Struktur vor:



Augier konnte aus Polysacchariden der Extrakte, welche die Rotalge *Agardhiella tenera* (Solieriacee) lieferte, durch enzymatischen Abbau mittels eines Hefeautolysats Galaktose sowie Galaktose- und Mannose-schwefelsäure gewinnen. Man sieht an diesem Beispiel, welche grosse Möglichkeiten die Verwendung spezifischer Enzyme zur Konstitutionsaufklärung komplizierter Naturstoffe bietet.

Die Gegenwart eines spezifischen Ferments in Pneumokokken, Streptokokken und *Cl. welchii*, welches den Monoschwefelsäureester der Hyaluronsäure hydrolytisch zu spalten vermag (K. Meyer und Chaffee) lässt vermuten, dass auch im Pflanzenreich Mucopolysaccharidsäuren vorkommen.

In neuerer Zeit sind synthetische Schwefelsäureester hochmolekularer Alkohole der allgemeinen Formel ROSO_2ONa , die als Netz-, Wasch-, und Schaummittel Anwendung finden, auf ihre bakteriostatische Wirkung untersucht worden. Es zeigte sich, dass nur grampositive Parasiten beeinflusst werden (Cowles). Vermutlich handelt es sich um Einwirkungen auf die komplexen Systeme der Zellgrenzflächen.

B. Sulfonsäuren

Stoffe der Zusammensetzung RSO_3H sind im phytochemischen Stoffwechsel erst in allerneuester Zeit beobachtet worden, so die Methylsulfonsäure $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ von Specht. Ihre Bildung im intermediären Schwefelstoffwechsel ist jedoch wohl bei allen Pflanzen anzunehmen.

Von Folkers, Koniuszy, und Shavel, Jr., wurden 1944 zwei Alkaloidester der Sulfoessigsäure $\text{HO}_2\text{S}\cdot\text{CH}_2\text{COOH}$ in *Erythrina glauca* Willd., *E. pallida* Britton und Rose sowie *E. Poeppigiana* (Walp.) entdeckt. Vermutlich handelt es sich nicht um Carbonsäure- sondern um Sulfosäureester. Die beiden Verbindungen haben folgende Zusammensetzung: Erysothiovin $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_7\text{NS}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, F. 187°, $[\alpha]_D^{25} = +208^\circ$ (A., c 0.4) und Erysothiopin $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{O}_7\text{NS}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, F. 168–169°, $[\alpha]_D^{25} = +194^\circ$ (A., c 0.1). Sie verdienen neben ihrer merkwürdigen Zusammensetzung noch insofern Interesse, als sie in Mengen von 1 mg./kg. beim Frosch eine curareähnliche Paralyse hervorrufen.

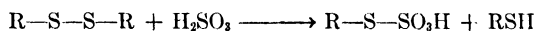
C. Sulfit

Das Vorkommen von schwefliger Säure als Stoffwechselprodukt in pflanzlichen Zellen (Phloem der Wurzeln und Sprosse) ist von Nightingale, Schermerhorn, und Robbins beschrieben worden; die Existenz eines, wenn auch tierischen, Enzyms, das aus L-Cysteinsulfosäure Sulfit abspaltet (Fromageot und Chatanger), ist bemerkenswert.

Viele Pflanzen kommen mit schwefliger Säure bzw. Schwefeldioxyd, einem Bestandteil industrieller Abgase, in Berührung und es hat sich auf Grund zahlreicher Untersuchungen gezeigt, dass grüne Pflanzen höhere Konzentrationen von SO_2 nicht vertragen. Die schweflige Säure wird sowohl aus der Luft wie auch aus dem Boden von den

Pflanzen aufgenommen. Besonders instruktiv waren in dieser Hinsicht amerikanische Arbeiten mit radioaktiven Schwefel (Thomas). Es hat sich nachweisen lassen, dass Weizen, Mais, Beete und Tomaten den Schwefel der schwefligen Säure in den gleichen Organen deponieren, in denen sie ihn aus Nährlösungen aufnehmen.

Der Hauptangriffspunkt der schwefligen Säure in der pflanzlichen Zelle dürfte die Disulfidgruppe (s.u.) sein. Sehr wahrscheinlich kommt es zu Umsetzungen mit dem SS-Glutathion oder Disulfidproteinen in der von Micheel und Emde beschriebenen Weise, wobei Thiolsulfosäuren und Thiole gebildet werden:



Ausgehend von L-Cystin erhält man dabei bei gewöhnlicher Temperatur Cysteinthiosulfosäure $\text{HOOC} \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{S} \cdot \text{SO}_3\text{H}$, F. 184–185°. Disulfidproteine werden durch Aufspaltung der "SS-Roste" in Polypeptidketten zerlegt. Derartige schwere Eingriffe werden von der pflanzlichen Zelle, in der katalytisch wirksame Eiweisskörper mit Disulfidbindungen sehr zahlreich vorkommen, naturgemäss nur schwer ertragen. Es nimmt daher nicht Wunder, dass zahlreiche Arbeiten die schädliche Wirkung hoher Konzentrationen der schwefligen Säure auf den Pflanzenwuchs beschrieben haben. Es kommt zu Assimilationsstörungen, Chlorose und anderen Ausfallserscheinungen.

Die Resistenz der Pflanzen gegen SO_2 sinkt mit steigender Temperatur und Feuchtigkeit. Pflanzen von schlechtem Boden sind empfindlicher als solche von gutem Boden, solche aus starkem Schatten empfindlicher, als solche, die ohne Beschattung wuchsen. Junge Pflanzen sind widerstandsfähiger, als ältere, Blätter im mittleren Alter sind am empfindlichsten (Setterstrom und Zimmerman).

Bemerkenswert ist eine bei Luzerne, die von den landwirtschaftlichen Futterpflanzen am meisten durch SO_2 -Begasung geschädigt wird, beobachtete Ertragssteigerung durch geringe SO_2 -Konzentrationen. Es scheint sogar, dass in diesem Falle der Schwefelbedarf aus dem geringen SO_2 -Gehalt der Luft gedeckt werden kann. Unter Einwirkung von geringen SO_2 -Mengen nimmt jedenfalls der Gesamtschwefel der Luzerne merklich zu, was im Sinne der Micheel'schen Versuche auch plausibel erscheint. Bei Cruciferen liess sich keine Ertragssteigerung feststellen (Setterstrom, Zimmerman, und Crock-

er). Auch bei Weizen vermag SO_2 in niedrigen Konzentrationen den Körnerertrag leicht zu steigern (Swain und Johnson). Die aufgenommene schweflige Säure wird von der Pflanze zu Sulfat oxydiert, das in die Wurzeln und in das umgebende Erdreich wandert (Thomas und Hill).

Bei der Einwirkung von hohen Konzentrationen von SO_2 auf Mikroorganismen und Pilze, wie es bei der Konservierung und Sterilisation der Fall ist, kommt es zu schweren Störungen des enzymatischen Stoffwechsels der Zellen, so dass diese zugrundegehen. Bei der fungiziden Wirkung des elementaren Schwefels ist zweifellos das durch Luftoxydation (besonders im Sonnenlicht) entstandene SO_2 ein wirksamer Faktor (Reckendorfer).

In Gegenwart eines lackmusneutralen Gemisches von Sulfit und Bisulfit vermag Hefe bekanntlich (Bernhauer) Glucose zu Glycerin und Acetaldehyd neben etwas Alkohol zu vergären. Der Acetaldehyd, normalerweise die Muttersubstanz für das Aethanol, wird hierbei durch das Natriumsulfit gebunden, das als Abfangmittel dient. Die Gärungsgleichung lautet:



Dieses von Neuberg und Färber 1916 ausgearbeitete Verfahren der gärungstechnischen Glycingewinnung beweist, dass manche Organismen, wie hier die Hefe, beachtliche Konzentrationen (etwa 10%) von Sulfit ohne Schaden vertragen können. In diesem Zusammenhang sei darauf verwiesen, dass manche Pilze, wie *Mucor silvaticus* und verschiedene Fusarium—sowie Penicilliumarten auf Sulfitablauge gedeihen, wobei Oelspeicherung in den Hyphen und Chlamydo-sporen auftritt (Niethammer). Auch H_2S -Bildung kann in Abwässern mikrobiologisch aus Sulfitablauge auftreten, allerdings erst nachdem das SO_2 der Ablauge verbraucht ist (Winter). Auf die technische Gewinnung von Sprit, Futterhefe, Eiweisshefe, Butanol und Aceton, Citronensäure u.a. Produkten aus Zellstoffablauge kann hier nicht eingegangen werden.

D. Thioäther

Alicyclische Thioäther, Alkylsulfide, Dimethylpropiothetin, Djenkolsäure, Adenyl-D-thiomethylribose. Die Abkömmlinge des Schwefelwasserstoffs, in denen beide Wasserstoffatome desselben durch organische Reste ersetzt sind, also die Thioäther, kommen im Pflanzenreich verhältnismässig selten vor. Pilze und Algen auf der

einen Seite und hauptsächlich Lauchgewächse auf der anderen Seite sind nach unseren bisherigen Kenntnissen die Lieferanten dieser Stoffgruppe. Aber in neuerer Zeit ist mit steigendem Interesse am phytochemischen Stoffwechsel der Schwefelverbindungen eine Reihe recht interessanter Beobachtungen gemacht worden, aus denen hervorgeht, dass aliphatische Thioäther als Stoffwechselzwischenprodukte möglicherweise eine grössere Bedeutung besitzen, als man es vermuten konnte.

Vor allem ist hier auf das Methionin hinzuweisen, auf das im Abschnitt über die schwefelhaltigen Aminosäuren einzugehen sein wird. Dieser verhältnismässig spät entdeckte Proteinbaustein besitzt eine erstaunlich reaktionsfähige Methylgruppe, welche ebenso wie die Methylgruppe des Chelins auf verschiedene organische Verbindungen übertragen werden kann. Demnach fungiert nicht nur der Stickstoff, sondern auch der Schwefel in beiden Fällen als Radikalüberträger im intermediären Stoffwechsel. Unter Verlust seiner Aminogruppe vermag das Methionin entweder die entsprechende Propionsäure zu liefern, oder es findet eine Reduktion zu dem entsprechenden Alkohol statt. Während der Alkohol als solcher entdeckt werden konnte, hat man die Methylthiopropionsäure nur in Form eines Thetins* isolieren können.

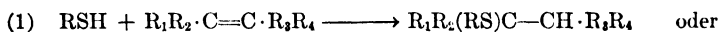
Die Spaltung einer Kohlenstoff-Schwefelbindung unter physiologischen Bedingungen, wie es bei der Methylwanderung vom Methionin der Fall sein muss, war bis vor kurzem rätselhaft. Nachdem nun jedoch am Cystathionin eine hydrolytische Spaltung (allerdings unter dem Einfluss eines tierischen Enzyms) beobachtet worden ist, ist eine baldige Aufklärung des Reaktionsmechanismus zu erwarten.

Es sei noch auf die Fähigkeit der Thioäther zur Bildung von Sulfoxyden und Sulfonen hingewiesen. Während noch vor wenigen Jahren diese Verbindungen in den Handbüchern der organischen Chemie ein museales Dasein führten, sind sie nun verschiedentlich als Oxydationsprodukte von Thioäthern unter den Stoffwechselprodukten pflanzlicher und tierischer Organismen aufgetaucht. Es ist denkbar, dass ihnen bei oxydoreduktiven Umsetzungen der Schwefelverbindungen eine nicht unwesentliche Rolle zufällt.

Die Bildung aliphatischer Thioäther in der pflanzlichen Zelle aus

* Unter Thetinen $R_1R_2S^+(-RCOO^-)$ bzw. $R_1R_2S^+(-RCOOH)Hal^-$ versteht man den Betainen analog gebaute Verbindungen des Schwefels, die synthetisch durch Addition von halogenierten Fettsäuren an Thioäther erhältlich sind (vgl. E. I. du Pont de Nemours & Co.).

den dort vorliegenden Thiolen ist stets dann zu erwarten, wenn organische Verbindungen mit Doppelbindungen oder mit reaktionsfähigem Halogen, etwa Monojod- oder Monobromessigsäure, auf pflanzliche Zellen oder Gewebe einwirken. Nach:



entstehen dabei Thioäther. Derartige Halogenverbindungen sind wirksame Destruktoren (Bersin) von Thiolenzymen.

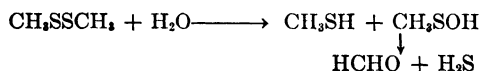
Das erste Beispiel für eine Methylierung von anorganischem Schwefel entdeckten Birkinshaw, Findlay, und Webb. Sie konnten zeigen, dass der holzzerstörende Pilz *Schizophyllum commune* auf einem Nährboden aus Glucose und anorganischem Sulfat Methylmercaptan CH_3SH und Spuren von Schwefelwasserstoff H_2S entwickelt.

Challenger und Charlton erweiterten diesen Befund dahin, dass auch Dimethylsulfid $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ und Dimethyldisulfid CH_3SSCH_3 (augenscheinlich als Oxydationsprodukt von Methylthiol CH_3SH) gebildet werden.

Das Dimethylsulfid CH_3SCH_3 , Kp. 37.5° , ist als Stoffwechselprodukt verschiedener Pilze und Algen bekannt. Da es bei der alkalischen Zersetzung von Dimethylpropiothetin (s.u.) neben Acrylsäure entsteht, wird angenommen, dass es auch in vivo aus diesem Thetin gebildet wird, dessen Muttersubstanz wahrscheinlich Methionin ist.

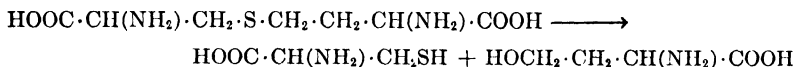
Auffallenderweise vermag der obenerwähnte Pilz *S. commune* Dimethyl-, Diäthyl-, und Di-*n*-butyldisulfid zu den entsprechenden Thiolen zu reduzieren, wobei in ersterem Falle auch etwas Dimethylsulfid entsteht. Diese Mercaptanbildung aus Disulfiden wird zweifellos mittels Glutathion bewerkstelligt, welches aus dem Reservoir der Kohlenhydratspaltprodukte die benötigten Wasserstoffatome erhält (vgl. Glutathion).

Der von dem Pilz neben Methylmercaptan gebildete Schwefelwasserstoff entsteht entweder als Produkt einer Reaktion von Schöberl:



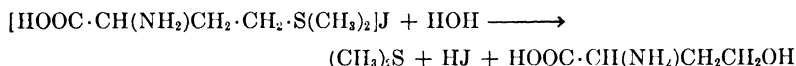
oder aus dem anorganischen Sulfid, das möglicherweise vom Pilz aus dem anorganischen Sulfat gebildet wird (Stephenson, Ellis).

Die Bildung von Methylmercaptan kann nur durch die Sprengung einer Kohlenstoff-Schwefel-Bindung zustande kommen. Hierfür liegt nur ein einziger biologischer Befund vor, nämlich die durch ein Leber- bzw. Nierenenzym der Ratte bewirkte Spaltung des Cystathionins:



zu Cystein und vermutlich Homoserin oder dessen Phosphorsäure-ester (Brown und du Vigneaud; du Vigneaud, Brown und Chandler; Binkley, Anslow und du Vigneaud; Binkley). Diese Spaltung ist reversibel (Binkley und du Vigneaud) und es spielt daher das Cystathionin eine wichtige Rolle bei der biologischen Umwandlung von Methionin in Cystein bzw. Cystin (Stetten; du Vigneaud und Mitarbeiter, 1944).

Bemerkenswert ist der von Challenger und Charlton erhobene Befund, wonach *S. brevicaulis* auf Brotkulturen Methioninmethyljodid (vgl. Toennies und Kolb) unter Bildung von Dimethylsulfid, jedoch nicht CH_3SH , abbaut. Möglicherweise entsteht dabei α -Aminoäthanolessigsäure als zweites Spaltprodukt nach:



Die eben genannte Sulfoniumverbindung des Methionins gehört zu der bis vor kurzem in der Natur nicht aufgefundenen Klasse der Thetine (aus Thio und Betain zusammengesetzt). Derartige Sulfoniumcarbonsäuren spalten leicht Wasser oder Halogenwasserstoff ab unter Bildung innerer Salze, wie es bei den Betainen der Fall ist. Thetine sind schwache Basen. Nun wurde von M. T. Simpson und Challenger (vgl. Challenger und Charlton) aus der roten Alge *Polysiphonia fastigiata* das *S*-Dimethyl- β -propiothetin-chlorid:



isoliert. Daraus entsteht das von Haas bei dieser Alge beobachtete Dimethylsulfid CH_3SCH_3 .

Von Challenger stammen auch folgende Beobachtungen. Zugabe von Diäthylsulfid $\text{C}_2\text{H}_5\cdot\text{SS}\cdot\text{C}_2\text{H}_5$ zu Kulturen von *Penicillium brevicaulis* Saccardo führt zur Bildung von Aethylmercaptan $\text{C}_2\text{H}_5\text{SH}$ und Methyläthylsulfid $\text{CH}_3\text{SC}_2\text{H}_5$. Aus Di-*n*-propylsulfid $\text{C}_3\text{H}_7\cdot$

SSC_3H_7 entsteht *n*-Propylmercaptan $n\text{-C}_3\text{H}_7\text{SH}$ und Methyl-*n*-propylsulfid $\text{CH}_3\text{S-}n\text{-C}_3\text{H}_7$. Im Anschluss an eine Hydrierung wird hier also eine Methylierung, vielleicht mittels Methionin, durchgeführt.

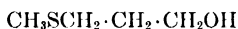
Die Bildung der ungesättigten Thioäther in höheren Pflanzen ist bisher noch nicht geklärt.

Das Diallylsulfid $(\text{CH}_2:\text{CH}\cdot\text{CH}_2)_2\text{S}$, Kp. 140° , ist ein farbloses, widerlich riechendes Oel von geringer Wasserlöslichkeit. Es kommt zusammen mit Allylsenöl im ätherischen Oel von *Cochlearia armoracia*, sowie in den Wurzeln mancher Akazienarten vor. Mit Silbernitrat liefert es eine krystallisierende Verbindung $(\text{C}_3\text{H}_6)_2\text{S}\cdot 2\text{NO}_3\text{Ag}$.

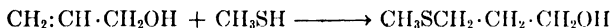
Das Vinylsulfid $(\text{CH}_2:\text{CH})_2\text{S}$, Kp. 101° , spez. Gew. 0.9125, kommt als Hauptbestandteil im ätherischen Oel von *Allium ursinum* neben einem Polysulfid und einem Mercaptan vor.

Man wird wohl nicht fehl gehen, als Muttersubstanzen dieser Thioäther ebenfalls das Methionin anzusehen bzw. das in der Natur noch nicht aufgefundene Homocystein.

Von Akabori und Kaneko wurde aus dem durch Fermentation gewonnenen "Shoyu" (japanische Maggi) ein flüchtiger Riechstoff isoliert, welcher auf Grund von synthetischen Versuchen die Konstitution eines γ -[Methylmercapto]-propylalkohols:



besitzt. Er wurde Methionol genannt. Wahrscheinlich ist das Methionol, Kp₂₃ $99\text{--}101^\circ$, aus Methionin durch Desaminierung und Reduktion entstanden. Bemerkenswert ist die, wenn auch langsam verlaufende Synthese bei Zimmertemperatur aus Allylalkohol und Methylmercaptan nach:



die durch Licht und Sauerstoff beschleunigt wird.

Schliesslich sei noch ein kürzlich entdeckter Thioäther erwähnt, der vermutlich aus Methionin oder Cystin entstanden ist. Von Haagen-Smit und Mitarbeitern wurde aus den höher siedenden Fraktionen der flüchtigen Stoffe des Ananassaftes der β -Methylthiopropionsäuremethylester



isoliert. Sein Sulfon zeigt den Schmelzpunkt F. $93.6\text{--}94^\circ$. Es

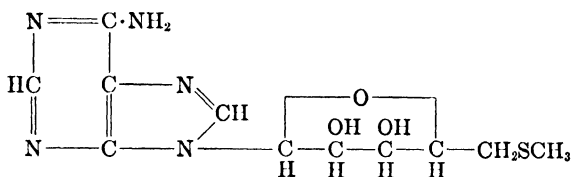
scheint durch Isomerisation des Thetin-anhydrids $(\text{CH}_3)_2\text{S}^+\cdot\text{CH}_2\text{-COO}^-$ entstanden zu sein.

Als Thioäther kann auch die nachfolgend beschriebene Djenkolsäure aufgefasst werden.

Djenkolsäure. Im Jahre 1934 wurde von den Holländern van Veen und Hijman in der Djenkolbohne, die in Niederländisch-Indien zu Vergiftungserscheinungen Anlass gegeben hatte, die Djenkolsäure, das L-Cysteinthioacetal des Formaldehyds, $\text{CH}_2[-\text{S}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}]_2$ entdeckt. Die Synthese erfolgte bald darauf durch du Vigneaud und Patterson. Dieser eigenartige Thioäther krystallisiert in Nadeln. F. 300–350° (Zers.), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -44.5^\circ$ (1%ig. HCl).

Nach Genuss von 50 jungen Djenkolbohnen können aus dem Harn ohne Mühe rund 0.4 g. reine Djenkolsäure isoliert werden. Da die Verbindung sehr schwer löslich ist, führen Ausscheidungen im Urether von Djenkolkranken zu Verstopfungen und Nierenschädigungen.

Adenyl-D-thiomethylribose. Nachdem Suzuki und Mitarbeiter einerseits, Levene und Sobotka andererseits aus Hefe eine Adenylthiomethylpentose, F. 212°, isoliert hatten, gelang Wendt 1942 die Konstitutionsaufklärung dieses eigenartigen Thioäthers. Der Bau der Adenyl-D-thiomethylribose entspricht wahrscheinlich dem der Muskeladenylsäure:

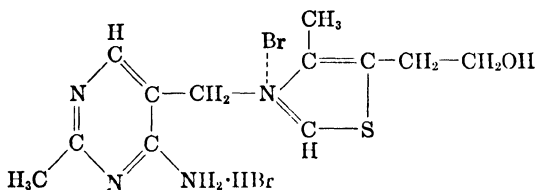
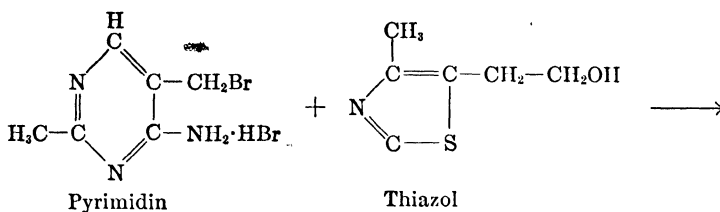


Cyclische Thioäther. *Aneurin (Thiamin).* Es ist hier nicht der Ort, um über die zahlreichen Arbeiten zu berichten, welche dem Vitamin B₁-Aneurin unter dem Gesichtspunkt seiner Bedeutung für die Ernährung des Menschen und der Tiere gewidmet sind. Hier soll lediglich die Natur des Aneurins als schwefelhaltige Substanz des Pflanzenreiches gewürdigt werden.

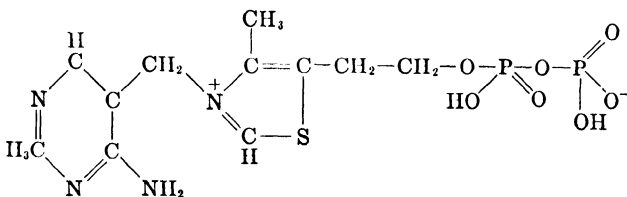
Bekanntlich wurde das erste Konzentrat von Aneurin 1911 aus der Reiskleie von Funk gewonnen, 15 Jahre später gelang es Jansen und Donath die Substanz in krystalliner Form darzustellen. Aber erst 1937 haben Williams sowie Andersag und Westphal unabhängig von einander die Synthese durchgeführt. Das Aneurin ist eine zwei-

säurige Base. Sein Dihydrochlorid, $C_{12}H_{18}N_4OSCl_2$, F. 252° bzw. $232-234^\circ$, ist in neutraler sowie alkalischer Lösung empfindlich gegen Wärme, oberhalb $pH = 3.5$ ist es auch bei höheren Temperaturen beständig. Gegen Oxydationsmittel und ultraviolette Strahlen ist es sehr empfindlich.

Das Molekül des Aneurins besteht aus einer Pyrimidin- und einer Thiazolkomponente, wie aus dem Verlauf der Synthese hervorgeht:



In dieser Form ist der Schwefel in der Natur nicht wiederaufgefunden worden. In der Bierhefe liegt das Aneurin nach Lohmann und Schuster als Diphosphorsäureester vor:



In Verbindung mit einem spezifischen Eiweisskörper fungiert dieser Aneurindiphosphorsäureester im Pflanzenreich als Ferment Carboxylase, welcher Brenztraubensäure zu Acetaldehyd und CO_2 spaltet. Der Aneurindiphosphorsäureester wird als Cocarboxylase bezeichnet. Nach Krebs und Eggleston ist ein Magnesium-Aneurindiphosphat-

Proteid, welches Green und Mitarbeiter isolierten, für die Oxalessigsäurebildung aus Brenztraubensäure und Kohlendioxyd verantwortlich:



Der Gehalt verschiedener Pflanzen an Aneurin in $\gamma\%$ nennt folgende Tabelle

Bäckhefe.....	600-2000	Kartoffel, roh.....	60-180
Bierhefe.....	810-36000	Apfel.....	20-40
Holzzuckerhefe.....	1500-2400	Birne.....	30-50
Weizen (Vollkorn).....	300-700	Zitrone, Apfelsine.....	50
Roggen (Vollkorn).....	240-420	Paprika.....	140
Gerste (Vollkorn).....	450-720	Johannisbeeren, schwarze..	10
Hafer (Vollkorn).....	450-630	Walnuss.....	200-300
Mais (Vollkorn).....	300-400	Erdnuss.....	800-1400
Hirse.....	250	Knoblauch.....	575
Buchweizen.....	250	Zwiebel.....	350
Reis, unpoliert.....	220-350	Schnittlauch.....	100-125
Weisskohl, roh.....	80-120	Petersilie.....	80-190
Rosenkohl.....	180-250	Weisse Bohnen.....	430-1600
Spinat, roh.....	60-220	Sojabohne.....	1000-1300
Karotte.....	60	echter Reizker.....	110
Spargel.....	200	Hydnum imbricatum..	50
Tomate.....	60-90	Boletus flavus.....	25
Tomatenkerne.....	1150	Psalliotia silvatica.....	12
grüne Erbsen.....	175		

Das Scutellum von Weizenkeimen, welches im Mittel 1.54% des Getreidekorns ausmacht, enthält 59% des gesamten Aneurin gehaltes des Kornes. Das Scutellum von Roggen, Mais, und Gerste weist ebenfalls sehr hohe Gehalte an Aneurin auf.

Nachgewiesen ist das Aneurin ferner in dem Pansenbakterien des Rindes, *Flavobacterium vitarumen*.

In den Knospen verschiedener Bäume wird Aneurin in erheblichen Mengen gebildet (Burkholder und Sinnott).

Was den Einfluss der Düngung auf den Aneurin gehalt anbelangt, so fanden Pfützer und Roth, dass durch Volldüngung und erhöhte Stickstoffdüngung der B₁-Gehalt von Getreidekörnern gesteigert werden kann. Diesem Ergebnis stehen andere Arbeiten gegenüber, bei denen keine Einfluss beobachtet werden konnte, was jedoch fraglich erscheint.

Das Aneurin kommt praktisch in den meisten Pflanzen vor, allerdings—abgesehen von Hefe—nur in geringer Konzentration. Vor allem wird es in den Samen von Hülsenfrüchten, sowie Getreidekeimlingen angetroffen, d.h. an den Stapelplätzen von Nährmaterial

für den sich entwickelnden Keim. Die Synthese des Aneurins kann schon bei Pflanzen der frühesten Entwicklungsstufen beobachtet werden. Guerrant, Sunderlin und Schieblich konnten zeigen, dass Colibazillen, die Cöcumbakterien der Ratte, Milchsäurebazillen, Smegma- und Timotheebazillen, Actinomyces, und Aspergillus usw. Aneurin aus einfachen Baustoffen aufbauen können. Andere Mikroorganismen dagegen sind auf die Zufuhr von Aneurin angewiesen, So z.B. *Staphylococcus aureus*, Propionsäurebakterien, Streptotrix und zahlreiche niedere Pilze der Gattungen *Phycomyces*, *Rhizopus*, *Mucor* (Tatum, Knight, Schopfer). Die Wachstumswirkung des Aneurins kann am Phykomyces-Test nach Schopfer-Jung, Meiklejohn, Morell zum Nachweis von 0.05 γ B₁ in 1 ml. ausgenutzt werden. Bei den höheren Pflanzen findet sich das Aneurin in allen lebenden Teilen. Ein äusserst empfindlicher Indikator für Aneurin ist die ausgeschnittene Tomatenwurzel, die in einer geeigneten Nährlösung nur bei Gegenwart von Aneurin bzw. seiner beiden Bruchstücke wächst (Robbus und Bastley), mit dieser Methode lässt sich B₁ noch in einer Verdünnung von 1:4 Billionen nachgewiesen. (Stapp-Schröder-Kühnau).

Das Aneurin kann, neben dem Pyridoxin und der Nicotinsäure, direkt als Wurzelwuchsstoff höherer Pflanzen bezeichnet werden, denn unter seinem Einfluss wird eine Steigerung der Wurzellänge, der Wurzelverzweigung und des Wurzeltrockengewichtes bewirkt.

Aus verschiedenen Arbeiten über den Einfluss von Aneurin auf das Wachstum grüner Pflanzen (Kögl, Bonner) geht hervor, dass z.B. im Dunkeln gehaltene Erbsenpflanzen einen geringen und nicht ansteigenden Gehalt an Vitamin B₁ zeigen. Im Licht nimmt die Aneurinmenge in den Blättern rasch zu und wird von dort in die wachsenden Wurzelspitzen transportiert. Bei schnellwachsenden einjährigen Pflanzen (Erbsen, Bohne, Tomate, Rettich) in Sandkulturen mit ausreichender Nährlösung wurde durch Aneurin keine Wachstumsförderung beobachtet (vgl. auch Mitchell), wohl aber bei langsam wachsenden Arten, wie *Aleurites fordii*, *Buginvillea glabra*, *Arbutus unedo*, *Eucalyptus ficifolia*, *Camellia japonica*.

Wenn die untersuchten Pflanzen genügend Aneurin selbst synthetisieren, ist ein Einfluss zusätzlicher Gaben natürlich kaum zu erwarten. Das scheint bei Tomate, Senf u.a. Pflanzen bei Gegenwart anorganischer Salze und Spurenelemente, sowie bei ausreichen-

der Belichtung und Belüftung der Fall zu sein (Arnon, Templeman, und Pollard).

Präparierte Wurzelspitzen von Erbsen sind imstande, aus der Pyrimidin- und Thiazolkomponente in ähnlicher Art und Weise, wie Mikroorganismen, das Aneurin zu synthetisieren (van Santen und Koningsberger). Die zahlreichen mikrobiologischen Arbeiten über den Einfluss von Aneurin bzw. seiner beiden Komponenten auf das Wachstum von Pilzen und Bakterien können an dieser Stelle nicht eingehend gewürdigt werden. Bekanntlich wirken die Komponenten entweder jede für sich allein, beide gemeinsam oder auch nur das fertige Vitamin B₁ (Boas).

Während isolierte Flachswurzeln mit Aneurin allein auskommen, benötigen Tomatenwurzeln dazu noch Pyridoxin (Vitamin B₆, die prosthetische Gruppe der Aminosäuredecarboxylase) und Nicotinsäure (zum Aufbau der Pyridinenzyme); Rettichwurzeln sind auf Aneurin und Nicotinsäure angewiesen.

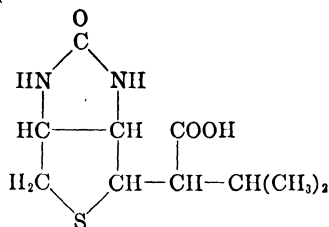
Es scheint also, dass Aneurin allein kein optimales Wurzelwachstum gewährleistet, denn auch Amlong und Naundorf berichten, dass ihnen bei Kohlarten, Kohlrüben, und Tabak erst eine Kombination von Aneurin, Ascorbinsäure und β -Indolylessigsäure (als Aktivator des Auxins) den maximalen Ertrag infolge besserer Bewurzelung ergab.

Die Ueberlegenheit von natürlichem Dünger, der etwa 0.1 mg. Aneurin je 1 kg. lufttrockenes Material enthält, gegenüber anorganischem Dünger, dürfte zu einem Teil auf diesem Vitamingehalt beruhen. Möglicherweise beruhen auch die Erfolge der verschiedenen Verfahren zur partiellen Sterilisation des humösen Bodens darauf, dass entweder aus zugrunde gegangenen Zellen von Mikroorganismen Wuchsstoffe freierwerden oder dass sich die nach der Behandlung wieder entwickelnden Bakterien als besonders gute Wuchsstoffproduzenten erweisen.

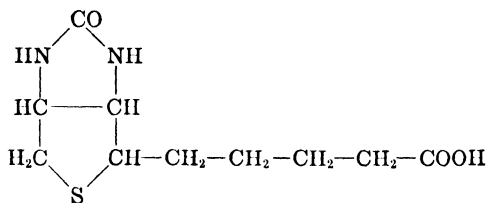
Die Biotine. Eine Gruppe organischer Substanzen, welche die Hefe und andere Mikroorganismen zu ihrer Vermehrung benötigen, wurde von Wildiers 1901 als "Bios" bezeichnet. Ehe die Konstitutionsaufklärung durch die Arbeiten von du Vigneaud und Kögl gelang, trug der Hauptbestandteil dieser Stoffgruppe die verschiedensten Namen (Bios II = Faktor X = Vitamin H = Coenzym R). Jetzt wissen wir, dass die fragliche Substanz in der Natur in zwei Formen vorkommt, die als α -Biotin und β -Biotin bezeichnet werden.

Es handelt sich um cyclische Thioäther, die nur ausnahmsweise (Reiskeleie) in freier Form vorkommen, meist dagegen als wasser- und alkoholunlösliche Verbindungen mit Eiweiss, die erst durch proteolytische Spaltung zerlegt werden können, vorliegen. Alkalische Hydrolyse ist nicht geeignet, da die Biotine dabei teilweise zerstört werden (Stepp-Schröder-Kühnau).

Nach Kögl besitzt das α -Biotin aus Eigelb nachstehende Konstitution:



Dem β -Biotin aus Leber und Milch kommt nach du Vigneaud folgende Struktur zu:



Das α -Biotin ist nur halb so wirksam, wie die β -Form. Die Synthese des α -Biotins wurde von Harris und Mitarbeitern 1943 durchgeführt; die 2'-Keto-3,4-imidazolido-2-tetrahydrothiophen-*n*-valeriansäure $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2\text{S}$, F. 230–232° (Zers.), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +92^\circ$ in 0.1 N Natronlauge, ist löslich in Alkohol und Wasser, hitzestabil und wird weder durch Säuren noch durch Alkalien zersetzt (Bicknell und Prescott).

Bei Verwendung von *Bac. radicola* bzw. *Rhizobium trifolii* als Testorganismen, die ohne Biotin sich nicht vermehren können (Steinberg), lassen sich noch 0.004 γ /Liter Biotin nachweisen. Hier fungiert der Stoff als Coferment der Atmung. Auch das Wachstum

des Erregers der Acetongärung (*Clostridium aceto-butylicum*) und die Säurebildung durch *Lactobacillus casei* (Snell und Mitarbeiter), können als Test zur Biotinbestimmung dienen.

Das Biotin ist in der Natur weit verbreitet. Besonders hoch ist der Gehalt in den der Fortpflanzung dienenden Organen der Pflanze (Roggenpollen 16, Erbsen 8–18, Petersiliensamen 20 $\gamma\%$). Das Biotin der Samen stellt ein Depot dar, welches nach Kögl bei der Keimung mobilisiert wird. Die Reiskleie enthält 19 $\gamma\%$. Reichlich findet es sich auch in Hefe, Kartoffelmehl, in Heidelbeer-, Luzerne-Maiglöckchen-, und Digitalisblättern, besonders viel in Kamilleblüten, während Koniferennadeln nur einen geringen Biotingehalt aufweisen. Die zur Moorbildung führenden Absterbe- und Verrottungsvorgänge zerstören den Biotin gehalt der pflanzlichen Ausgangsmaterialien nicht, denn die kolloiden Humusstoffe der Moore besitzen einen beträchtlichen Biotingehalt und eignen sich deshalb vorzüglich für das Gedeihen von biotinabhängigen Bodenmikroben (*Rhiz. trifolii* u.a.).

Bemerkenswert ist die Fähigkeit der Pansenbakterien der Kuh zur Biotinsynthese (McElroy und Jukes).

Aspergillus niger ist bei Anwesenheit von Pimelinsäure oder deren höheren Homologen (Suberin-, Azelainsäure) befähigt, Biotin zu synthetisieren. Durch Zusatz von Cystin oder Cystein wird diese Synthese noch gesteigert (Eakin and Eakin). Gewisse Stämme von *Staphylococcus aureus* benötigen nach Porter und Pelczar, Jr., neben anderen Wachstumsfaktoren, wie Aneurin und Nicotinsäure, auch Biotin. West und Wilson sowie du Vigneaud und Mitarbeiter machten die Identität von Coenzym R (Allison und Mitarbeiter) aus *Azotobacter* mit Biotin wahrscheinlich.

Bei höheren Pflanzen befördert es die Wurzelentwicklung und das Sprosswachstum bei der Keimung, in deren Verlauf es von den Kotyledonen zum Embryo transportiert wird (Erbsen). Die Wachstumswirkung wird von Arbutin und Digitonin gehemmt.

Das Schwefelatom des β -Biotins lässt sich durch Wasserstoff ersetzen, wobei das Desthiobiotin (du Vigneaud) entsteht. Dieses ist ebenso wie das Biotinsulfon (Dittmer und du Vigneaud) als Antibiotin wirksam (Lilly und Leonian).*

* Nach E. L. Tatum, "Desthiobiotin in the Biosynthesis of Biotin," *J. Biol. Chem.*, **160**, 455 (1945), soll allerdings Desthiobiotin von einem bestimmten *Pen. chrysoogonium* Stamm (Röntgenmutation Nr. 62078) als Vorstufe zum Biotin synthetisiert werden.

Den Gehalt an Biotin in verschiedenen der menschlichen Ernährung dienenden Produkten zeigt folgende Tabelle (nach Bicknell und Prescottt):

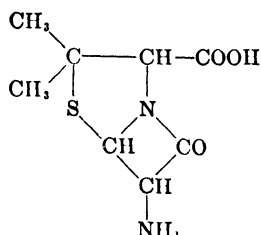
	Microgramm/ Gramm		Microgramm/ Gramm
Äpfel	0.009	Mais	0.058
Bananen	0.044	Zwiebel	0.035
Bohnen, getrocknet	0.098	Kartoffel	0.006
Beeten	0.027	Torula utilis	1.33
Kohl	0.024	Braueriehefe	0.071
Karotten	0.025		

Bemerkenswert ist die Belieferung von *B. radicola* mit Biotin durch die Wirtspflanze (Luzerne), wie es die Versuche von Nielsen und Johansen gezeigt haben.

Die Penicilline. Zu den schwefelhaltigen Stoffen des Pflanzenreiches gehören auch die im Hinblick auf die Humantherapie in den letzten 10 Jahren intensiv bearbeiteten Penicilline. Man versteht darunter antibiotische Stoffe von Penicilliumarten. Bei der mikroskopischen Kontrolle von Staphylokokken-Kulturen fand Fleming 1928 eine Platte mit einer zufällig hineingeratenen Schimmelpilzkolonie. Auffällig war, dass die umliegenden Staphylokokken durch Lysis zugrunde gegangen waren. Fleming erkannte, dass diese Erscheinung auf eine antibakterielle Substanz zurückzuführen war, welche der Schimmelpilz ausgeschieden hatte. Der Pilz wurde von Raistrick als *Penicillium notatum* Westling identifiziert (vgl. Killian).

Die Reinigung und Isolierung des Penicillins aus dem Nährmedium erwies sich als ausserordentlich schwierig. Erst 1942 gelang Florey und Chain die Isolierung und 1946 war die Konstitutionsforschung mit der Synthese aus Penicill-amin-D-chlorhydrat und 2-Benzyl-4-methoxy-methylen-5-oxazolone, welche allerdings nur 1% Ausbeute lieferte, abgeschlossen (vgl. Hoffmann-Walbeck). Nachdem sich herausgestellt hatte, dass von *Penicillium notatum*-Kulturen bei verschiedenem Nährmedium und zum Teil auch zeitlich getrennt zwei verschiedene antibiotische Substanzen produziert wurden, nannte man diese beiden zunächst Penicillin A und Penicillin B (Vgl. P. Kühne). Während Penicillin B, das auch Notatin, Penatin, und Penicidin genannt wird, eine Wasserstoffsperoxyd produzierende Redoxase vom Flavintypus ist, erwies sich Penicillin A als ein Gemisch. Bisher sind 5 verschiedene Penicilline aus *Penicillium*

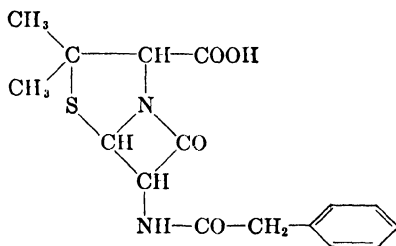
chrysogenum notatum bekannt geworden, die alle ein gemeinsames Grundgerüst—Penin genannt—enthalten (Morgenstern):



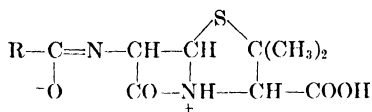
Die primäre Aminogruppe des Penin. ist bei den einzelnen Penicillinen säureamidartig mit.

- (1) Hexensäure, $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$ (Penicillin F oder I)
- (2) Capronsäure, $\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_4 \cdot \text{COOH}$ (Dihydropenicillin F)
- (3) Phenyllessigsäure, $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$ (Penicillin G oder II)
- (4) *p*-Oxyphenyllessigsäure $\text{HO} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$ (Penicillin X oder III)
- (5) *n*-Caprylsäure, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$ (Penicillin K oder IV) besetzt.

Die Penicilline sind starke einbasische Säuren, deren wässrige Lösungen ein $\text{pH} = 2.8$ zeigen. Die stärkste Wirksamkeit besitzt das Penicillin G, das in Form des Na-, Ca-, Percain- oder Trimethylammoniumsalzes benutzt wird:

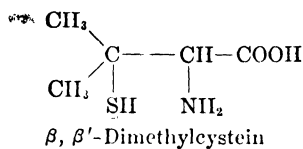


Einige chemische Eigenschaften des Penicillins sprechen nach Robinson dafür, dass es auch als ein "Protomer" :



auftreten kann.

Im Gerüst der Penicilline liegt eine schwefelhaltige Aminosäure vor, die bisher in der Natur noch nicht aufgefunden worden ist:



Merkwürdigerweise hat nun dieses Homologe des Cysteins auch noch die unnatürliche *D*-Konfiguration, d.h. es leitet sich die Aminosäure nicht wie alle anderen Eiweissbausteine genetisch vom *L*-Glyzerinaldehyd, sondern vom *D*-Glyzerinaldehyd ab. Die Na-, K-, und Rb-Salze des Penicillins wurden röntgenographisch untersucht. Die vollständige Fourier-Analyse ergab das Vorliegen einer β -Lactamverbindung, sodass der auffällige viergliedrige Ring im Molekül gesichert erscheint.

Sehr empfindlich gegenüber Penicillin sind die pyogenen Kokken, und zwar die *gram-positiven* (Staphylo-, Strepto-, und Pneumokokken) sowie die *gram-negativen* (Gono- und Meningokokken). Ihre Entwicklung wird bereits durch Verdünnungen von meist über 10 Millionen noch völlig gehemmt. Während *Micrococcus catarrhalis* noch reagiert, sind die ausgesprochen saprophytischen Kokken und namentlich die Enterokokken ganz unempfindlich.

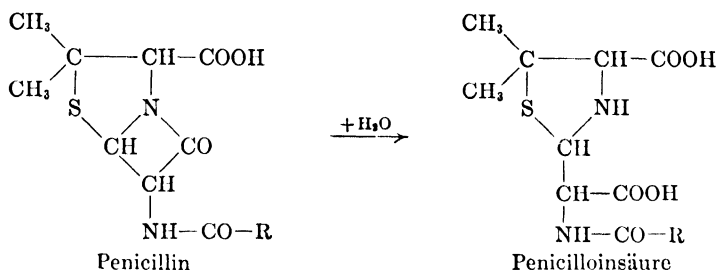
Bei den Bazillen werden nur die *gram-positiven** stark gehemmt, nämlich die Diphtheriebakterien und die Diphtheroiden, die anaeroben Sporenbildner (Tetanus, Gasödem), die Aktinomycceten und die Milchsäurebakterien. Auf *gram-negative* Bakterien wirkt Penicillin im allgemeinen nicht ein, auch Hefe und Pilze sind widerstandsfähig.

Innerhalb ein und derselben Bakterienart zeigen sich Unterschiede. So existieren beim *Staphylococcus aureus* resistente Stämme. Diese

* Die *gram-positive* Färbung ist auf den Gehalt der Keime an Magnesiumribonucleinat zurückzuführen (Stacey).

Resistenz liess sich auch *in vitro* durch Anpassung erzeugen. Vermutlich handelt es sich um eine adaptive Enzymneubildung.

Bei der enzymatischen Zerstörung handelt es sich um die Hydrolyse einer Säureamidbildung. Die Penicillase gehört also zu den Amidasen (vgl. Bersin). Aus dem Penicillin entsteht durch Aufnahme von 1 Mol Wasser die Penicilloinsäure:



Wie Chain und Mitarbeiter zeigen konnten (vgl. auch Harper) enthält nämlich eine Reihe von mehr oder minder resistenten Bakterien, wie verschiedene Paracoli-Stämme, Coli, *Bacterium aerogenes* und ein Luftmicrococcus, ein Enzym Penicillase, welches in neutraler oder alkalischer Lösung Penicillin zu zerstören vermag. Dieses Enzym ist sicher eine wesentliche, wenn auch nicht die einzige Ursache für die Resistenz der unempfindlichen Bakterien.

Auch durch Takadiastase, ein Enzymgemisch aus *Aspergillus*arten, und noch mehr durch Clarase wird die antibakterielle Wirkung des Penicillins gehemmt (Lawrence).

Was die Wirkungsweise des Penicillins anbetrifft, so hat eine Arbeit von Gale und Taylor gezeigt, dass nur wachsende Bakterien angegriffen werden. Erfahrungsmässig ist die Fähigkeit, Glutaminsäure aus dem Nährmedium zu assimilieren und interzellulär als freie Säure zu konzentrieren, auf *gram-positive* Bakterien beschränkt. Gerade diese werden aber von Penicillin gehemmt. Die Energie, welche aufgebracht werden muss, um die Glutaminsäure durch die Zellwand diffundieren zu lassen, wird durch die Vergärung von Glucose von den Bakterien geliefert. Im Gleichgewicht ist die intracelluläre Konzentration von Glutaminsäure bedeutend höher als die im Aussenmedium. Es wurde nun der Zellinhalt eines Stammes von *Staphylococcus aureus*, der zu einer starken Konzentrierung von Glutaminsäure imstande war, während des normalen Wachstums und nach Zugabe

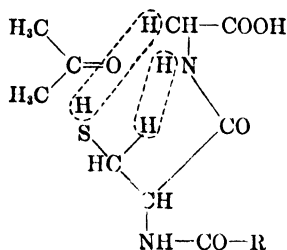
von Penicillin zur Nährlösung untersucht. Es zeigte sich, dass in Gegenwart des Antibiotikums zunächst die intrazelluläre Konzentration der Glutaminsäure innerhalb der ersten Stunde normal zunahm, dann sank sie jedoch schnell ab und zu demselben Zeitpunkt, an dem die Trübung nicht mehr zunahm, also das Bakterienwachstum aufgehört hatte, war eine konstante Höhe erreicht. Die Assimilationsfähigkeit war weder durch Waschen mit Wasser, noch durch Behandlung mit L-Cystein wiederherzustellen. Das Penicillin bewirkte ein allmähliches Erlöschen der Zellatmung und nach mehreren Stunden trat Lysis ein. Da Penicillin auf ruhende Zellen *keinen* Einfluss ausübt, vermuten Gale und Taylor, dass eine Reorganisation der Zellwand eingetreten sein muss, wodurch der Assimilationsmechanismus blockiert wird.

Pratt und Dufrenoy haben gelegentlich von Studien über die Einwirkung von Penicillin auf *Staphylococcus aureus* gefunden, dass in der Zone des nichtgestörten Wachstums die Thiolreaktion stets positiv war, während in der Zone des verhinderten Wachstums Thiole nicht nachgewiesen werden konnten. Der Verlust der Färbbarkeit des gram-positiven Komplexes—nach Henry und Stacey ein Magnesiumribonucleinat mit assoziierten HS-Gruppen—bei der Umwandlung von Bakterien in fadenförmige Zellen durch Penicillin (Verhinderung der Zellteilung) ist mit einem Schwund der HS-Gruppen durch Oxydation zu SS-Gruppen verbunden. Im Einklang hiermit fand Cavallito, dass Cystein als Thiol die bakteriostatische Wirkung des Penicillins aufheben kann, während Spuren von Co(II)-Salzen, welche bekanntlich die Thiole durch Komplexbildung ausschalten, die Empfindlichkeit der Mikroorganismen gegenüber Penicillin erhöhen. Die Aktivität von Ribonucleinase wird übrigens durch Penicillin herabgesetzt. Auf Grund der Angaben von Nickerson muss man schliessen, dass durch die Penicilline die Zellteilung, welche an das Vorliegen freier HS-Gruppen gebunden ist, verhindert wird.

Aus L-Penicillamin synthetisiertes Penicillin ist biologisch inaktiv (Work). Bemerkenswert ist die Feststellung von Pulvertaft, dass sich Bakterien in Gegenwart von kleinsten Penicillin-Mengen, die für eine völlige Bakteriostase nicht mehr ausreichen, zu Riesenformen auswachsen.

Penicillin wirkt auf die Ruheatmung der Kokken nicht ein, unterbindet aber in höheren Konzentrationen jeden Gaswechsel im Stadium der Vermehrung, d.h. zerstört sie.

Abschliessend sei noch auf den Mechanismus der Penicillinsynthese *in vivo* eingegangen. Es kann angenommen werden, dass das Penicillingerüst in den Pilzzellen durch Kondensation von im Stoffwechsel gebildetem Aceton (man denke an die Butanol-Aceton-Gärung) mit Acyl-D-cysteinyl-glycin (vermutlich aus Glutathion) und gleichzeitige enzymatische Dehydrierung gebildet wird:



Ungewiss bleibt der Zeitpunkt, zu dem das D-Cystein gebildet wird. Die Phenyllessigsäure des Penicillin G dürfte durch Desaminierung von Phenylalanin, die *p*-Oxyphenyllessigsäure des Penicillin X durch Desaminierung von Tyrosin entstanden sein. Die geradzahigen Fettsäuren der anderen Penicilline sind zweifellos biosynthetisch durch Aldolkondensation aus Brenztraubensäure gebildet worden.

Nach Smith und Bide kann die Ausbeute an Penicillin G durch Zusatz von β -Phenyläthylamin, Phenylacetamid, Phenyllessigsäure, N-(Phenylacetyl)glycin oder Benzylecyanid zur Nährlösung nahezu verdoppelt werden. Die optimale Konzentration beträgt 0.05%. Bei einer Konzentration von 1% ist auch Phenylalanin recht wirksam. Es handelt sich hierbei um eine partielle Biosynthese und nicht um eine Wachstumsbeschleunigung durch die zugesetzten Substanzen. In einem synthetischen Medium, das sonst nur zur Entstehung von Penicillin F führt, kann durch Zusatz von Phenylacetamid die Bildung von hauptsächlich Penicillin G erzwungen werden. Bemerkenswerterweise führt ein Zusatz von β -(*p*-Fluorphenyl)-äthylamin zur Bildung des entsprechenden *p*-Fluorbenzylpenicillins.

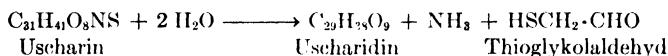
Auf schwefelfreier Nährlösung wächst der Schimmelpilz kaum. Von allen zugesetzten schwefelhaltigen Verbindungen vermag nur anorganisches Sulfat das Wachstum und die Penicillinbildung wesentlich zu stimulieren.

Howell, Thayer, und Labaw ist es gelungen, radioaktiven Schwefel ^{35}S durch Biosynthese in das Molekül des Penicillins einzubauen, und

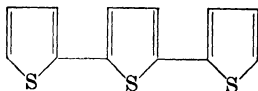
zwar dadurch, dass dem Kulturmedium $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ zugesetzt wurde. Nach der Bebrütung mit einem bestimmten Stamm von *P. notatum* konnte aus der Kulturflüssigkeit ein radioaktives Rohpenicillin gewonnen werden, dessen Aufarbeitung zum kristallisierten Tri-äthanolaminsalz des Penicillins G mit einem Schmelzpunkt von 140–150° führte; in diesem Salz war das Verhältnis $^{32}\text{S}:^{35}\text{S}$ das gleiche, wie im eingesetzten Natriumsulfat.

Usharin. Von Hesse, Reicheneder, und Eysenbach wurde aus frischem Milchsafte der Asclepiadaceen *Calotropis procera* und *Calotropis gigantea*, welche ein afrikanisches Pfeilgift liefern, eine schwefelhaltige Verbindung, das Usharin, $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{O}_8\text{NS}$, Zers. P. 265°, $[\alpha]_{\text{D}} = +29.0^\circ$ (Chlf.), isoliert. Dass es sich hier um einen Thioäther handelt, ist wahrscheinlich. Der Schwefel und der Stickstoff hängen dem Usharin nur sehr lose an; kurzes Erwärmen mit Säure spaltet den Stickstoff als NH_3 und den Schwefel als flüchtige organische Verbindung ab, wobei Usharidin $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_9$ entsteht, welches mit Borax in Isoanhydrocalotropagenin $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_6$, ein ungesättigtes Steroidlacton, übergeht.

Nach Hesse enthält das Usharin den Schwefel höchstwahrscheinlich in einem Thiazolidin- oder Thiazolring. Die Hydrolyse ist mit allem Vorbehalt folgendermassen zu formulieren:



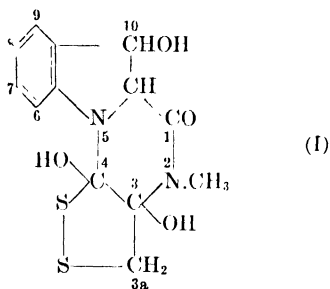
Terthienyl. Einen merkwürdig zusammengesetzten cyclischen Thioäther haben Zechmeister und Sease aufgefunden. Aus den gelben Blumenblättern der afrikanischen oder "Lemon"-Variätät der gewöhnlichen Dotterblume (*Tagetes erecta* L.) konnte in einer Ausbeute von 21 mg. je kg. Frischmaterial eine Substanz isoliert werden, die in Lösungen oder Adsorbaten eine intensive tintenblaue Fluoreszenz zeigte. Sie erwies sich identisch mit α -Terthienyl, F. 94–95.5° folgender Konstitution:



Die Verbindung zeigt weder Vitamin A-Aktivität, noch ist sie antibiotisch wirksam. Andere Variätäten der Dotterblume auf dem gleichen Versuchsfeld waren frei von dieser Verbindung, deren

Bedeutung für die Pflanze, ebenso wie ihr Bildungsmechanismus, unbekannt sind.

Gliotoxin Aus Kulturfiltraten von *Aspergillus fumigatus*, sowie aus *Gliocladium fimbriatum* und *Trichoderma lignorum* lässt sich (Weindling und Emerson; Johnson, Bruce, und Dutcher) ein gegen grampositive, nicht aber gramnegative Keime stark fungicid und bakteriostatisch hoch wirksames Antibiotikum Gliotoxin, $C_{14}H_{16}N_2O_4S_2$ oder $C_{13}H_{14}N_2O_4S_2$, isolieren. Die chemische Konstitution des Gliotoxins wurde von Johnson und Mitarbeitern als die eines Pyrazi- noindols mit einer Disulfidgruppe (I) erkannt (Eidridge und Spring):



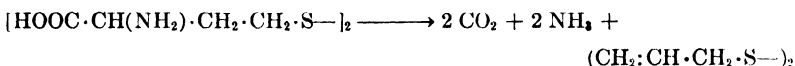
E. Stickstofffreie alicyclische Disulfide und Sulfoxyde

Die durch Oxydation von N-haltigen Mercaptanen gebildeten N-haltigen Disulfide werden uns noch bei der Besprechung der schwefelhaltigen Aminosäuren, Peptide, und Proteine zu beschäftigen haben. Hier soll nur auf die stickstofffreien Disulfide eingegangen werden, welche als Stoffwechselprodukte von Pilzen und Lauchgewächsen aufgefunden worden sind.

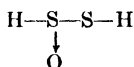
Wie schon oben erwähnt, ist das Dimethyldisulfid (Kp. 112° CH_3SSCH_3) augenscheinlich als Oxydationsprodukt des primär durch Methylierung von Schwefelwasserstoff von *Schizophyllum commune* gebildeten Methylmercaptans CH_3SH anzusehen. Dieser Pilz vermag ihm angebotene Disulfide glatt zu Mercaptanen zu reduzieren. *Penicillium brevicaulis* dagegen führt aliphatische Disulfide nicht nur in Mercaptane über, sondern methyliert sie anschliessend zu unsymmetrischen Thioäthern; so entsteht aus Diäthylsulfid $C_2H_5SSC_2H_5$ neben Aethylmercaptan, C_2H_5SH , auch Methyläthylsulfid $CH_3SC_2H_5$.

Diallyldisulfid, $(\text{CH}_2:\text{CH}\cdot\text{CH}_2\text{S}-)_2$, Kp.₁₆ 117°, findet sich neben verwandten Disulfiden nach Semmler im Knoblauch (*Allium sativum*).

Diallyldisulfidsulfoxyd, $\text{C}_3\text{H}_5\text{S}\cdot\text{S}(\rightarrow\text{O})\cdot\text{C}_3\text{H}_5$ wurde von Cavallito und Mitarbeitern ebenfalls aus dem Oel von Knoblauch isoliert. Beide Verbindungen werden nach einer Vermutung von Challenger und Charlton aus Homocystin nach:



gebildet; diese Reaktion zeigt eine Verwandtschaft zu dem bekannten enzymatischen Gleichgewicht zwischen Fumar- und Asparaginsäure. Das auch als Allyl-2-propan-1-thiolsulfinsäureester aufzufassende Disulfidsulfoxyd ist der einzige bisher bekannte Vertreter der hypothetischen thiolhyposchwefligen Säure:

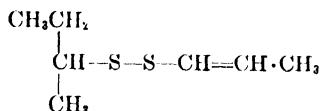


mit semipolar gebundenem Sauerstoff. Die beachtliche antibakterielle Wirkung dieser für die Heilwirkung des Knoblauchs augenscheinlich massgebenden Verbindung beruht nach Cavallito auf der Umsetzung mit biologisch wichtigen Thiolgruppen der Mikroorganismen. So reagiert z.B. Cystein sofort mit $\text{RS}\cdot\text{SO}\cdot\text{R}$ unter Bildung von $\text{RSSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$, also einem unsymmetrischen Disulfid. Eine Synthese des Diallyldisulfoxyds in 20–65%iger Ausbeute gelingt durch Oxydation des Disulfids mit äquimolekularen Mengen von Perbenzoe—bzw. Peressigsäure bei -20° bis $+50^\circ$.

Von Stoll und Seebeck ist das gleiche Disulfidsulfoxyd, von ihnen Allicin genannt, isoliert worden. Es konnte synthetisch aus Diallyldisulfid und Hydroperoxyd gewonnen werden. Die antibakterielle Wirkung soll sich sowohl gegen gram-positive wie gram-negative Keime erstrecken und etwa 15 Oxford-Einheiten je mg. betragen. Die Muttersubstanz in den Alliumarten ist das in krystalliner Form isolierte Alliin, $\text{CH}_2:\text{CH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{SO}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$, F. 163–165° (Zers.), $[\alpha]_{\text{D}}^{21} + 52.7^\circ$ ($c = 2$, Wasser), welches selbst antibakteriell unwirksam ist, aber durch ein Enzym Alliinase in Allicin umgewandelt wird.

Aus dem ätherischen Oel von *Asa foetida*, einem Harz gewisser asiatischer Umbelliferen, wurde von Mannich und Fresenius ein

höchst unangenehm riechendes Disulfid, das Isobutylpropenyldisulfid.

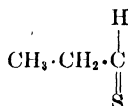


Kp.₁₀ 82–84°, $[\alpha]_{\text{D}}$ = –17.62° isoliert.

F. Thioaldehyde

Eine Klasse schwefelhaltiger Verbindungen, welche bis vor kurzem nur auf synthetischem Wege zugänglich war, stellen die Thioaldehyde dar. In ihrem Molekül ist der Sauerstoff der Aldehyde durch Schwefel ersetzt. Sie bilden sich leicht aus Schwefelwasserstoff und den Aldehyden, sind aber nur in alkalischer Lösung beständig; durch Wasserstoffionen findet eine Polymerisation zu cyclischen Verbindungen von dreifacher Molekulargrösse bzw. zu Makromolekülen kolloidalen Charakters statt. Wegen ihres unangenehmen Geruchs sind sie wenig bearbeitet worden.

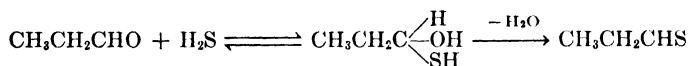
Erst 1947 wurde von Kohmann der monomere Thiopropionaldehyd, im Wasserdampf-Vakuum-Destillat von Zwiebeln als tränenreizende



Verbindung mit ziemlicher Sicherheit nachgewiesen. Das ätherische Oel der Zwiebel mit seinem hohen Sulfidgehalt bleibt bei dieser Art der Gewinnung zum grössten Teil im Rückstand.

Der Thiopropionaldehyd ist nur kurze Zeit existenzfähig, besonders unter der Wirkung von Säuren polymerisiert er sich unter Trübung der Lösung zu einer kolloidalen Verbindung, aus der durch Einwirkung von Brom Sulfat gebildet wird. Es gelang, das Mono- und Dinitrophenylhydrazon des Propionaldehyds aus der frisch hergestellten Lösung zu bereiten; bei der Umsetzung mit den entsprechenden Hydrazinen entstand erwartungsgemäss Schwefelwasserstoff. Die Lösung des monomeren Thiopropionaldehyds besitzt in Tröpfchenform stark tränenreizende Eigenschaften. In der Pflanze dürfte der Thioaldehyd als solcher nicht vorliegen; vermutlich entsteht er aus einer Additionsverbindung.

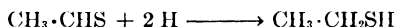
Was die Biosynthese anbelangt, so besteht die Möglichkeit einer Bildung aus Propionaldehyd und Schwefelwasserstoff nach:



Aldehyde sind als Produkte der Aldolkondensation und Abbauprodukte von Aminosäuren und Fettsäuren in der Natur in Form von Acetalphosphatiden entdeckt worden (Feulgen, Feulgen, und Bersin, Bersin und Mitarbeiter), so auch in den Chloroplasten von Spinatblättern (Menke und Jacob).

Es ist wahrscheinlich, dass der Thiopropionaldehyd eine der Ursachen für die Hemmung des Wachstums von Bakterien, Pilzen und Protisten durch die flüchtigen Zwiebelbestandteile ist, sowie er auch wundheilende Eigenschaften besitzt.

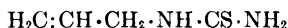
Die Thioaldehyde sind möglicherweise im allgemeinen nur Zwischenprodukte der Biosynthese auf dem Wege zu aliphatischen Thiolen, denn es ist bekannt (Neuberg, 1923), dass z.B. der Thioacetaldehyd durch Hefeenzyme zu Aethylmercaptan hydriert wird:



IV. THIOHARNSTOFFE UND SENFÖLE

A. Thioharnstoffe

Nach der Entdeckung von Chesney, Clawson, und Webster im Jahre 1928, danach Gemüsearten aus der Familie der Kreuzblütler (Wirsing, Weiss- und Rotkraut, Blumenkohl, Kohlrabi, weisse Rübe, Raps, Senf usw.) kropferzeugende Substanzen enthalten, kam Kennedy 1942 zu der Ueberzeugung, dass im Rapsamen ein Thioharnstoffderivat die wirksame Substanz sein müsste. Er erhielt in der Tat mit dem lange bekannten Allylthioharnstoff (Thiosinamin):



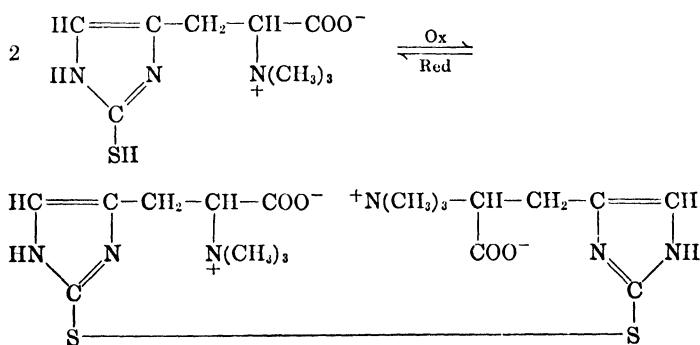
vom Schmelzpunkt F. 74°, Schilddrüsenvergrößerungen bei Ratten. Die Lösungen des Thiosinamins in Wasser, Alkohol, oder Aether schmecken bitter; mit Kupfersalzen bildet es charakteristische Komplexverbindungen. Der Allylthioharnstoff entsteht aus dem in *Sinapis nigra* und *Cochlearia armoracia* vorkommenden Allylsenföle und Ammoniak.

Bemerkenswert sind die von Thompson und Kosar beschriebenen keimungsfördernden Eigenschaften des Thiosinamins; wahrschein-

lich handelt es sich hierbei um die Verhütung eines Pilzbefalls der Samen durch das aus dem Thioharnstoff entstehende antibiotisch wirkende Senföl.

Raper hat 1946 eine annähernde Uebereinstimmung zwischen peroxydasehemmender und antithyreoider Wirkung bei 35 verschiedenen Thioharnstoffen beobachtet. Er schliesst daraus, dass die goetrogene Wirkung der Thioharnstoffe auf der Beseitigung des bei der Bildung des Thyroxins im tierischen Organismus entstehenden Wasserstoffperoxyds beruht.*

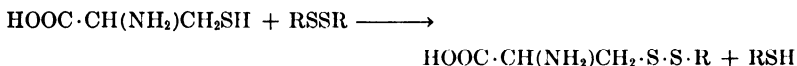
Ergothionein. Ein kompliziert zusammengesetzter Thioharnstoff; das Ergothionein, der gleichzeitig als Betain fungiert, ist von Tanret zuerst im Mutterkorn *Secale cornutum* und sodann auch im Blut entdeckt worden. Die Synthese wurde 1911 von Barger durchgeführt. Es handelt sich bei der cyclischen Schwefelverbindung, die auch in der tautomeren Form als Mercaptan reagieren kann und als solches bei der Oxydation ein substituiertes Dithioformamidin gibt:



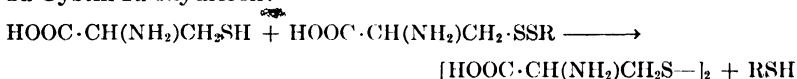
um ein Thiohistidin. Nach Lawson und Rimington kommt das Ergothionein in besonders grosser Menge im ungarischen Mutterkorn vor. Es zeigt wie die anderen Thioharnstoffe eine goetrogene, d.h. kropferzeugende Wirkung, vorausgesetzt, dass keine antistrumigenen Nahrungsmittel (Karotten, Salat, Hafer, Ascorbinsäure) bei der Fütterung verwandt werden. Der Angriffspunkt der Kohlkropfnoxe liegt wahrscheinlich in der Leber (Wagner-Jauregg). Uebrigens

* Nach Jung und Giggelberger, *Naturwissenschaften*, 35, 221 (1948), ist anzunehmen, dass der Thioharnstoff die Jodierung des Tyrosins durch Komplexbildung mit einem Kupferprotein verhindert.

kommt auch dem Methionin und in geringerer Masse auch dem Cystin eine schwache antithyreotoxische Eigenschaft zu. Von Toennies ist wahrscheinlich gemacht worden, dass das Ergothionein in der Disulfidform (s.o.) mit Cystein unter Bildung eines unsymmetrischen Disulfids reagieren kann:



Dieses vermag sodann Cystein unter Rückbildung von Ergothionein zu Cystin zu oxydieren:



Im Ganzen ergibt sich also eine bei Thiol-Disulfid-Systemen bekannte Oxydoreduktion (Bersin und Steudel).

Da Thioharnstoffe die Oxydation von Cystein durch Wasserstoffperoxyd beschleunigen, spielt das Ergothionein möglicherweise im Stoffwechsel des Cysteins eine Rolle (Lewis).

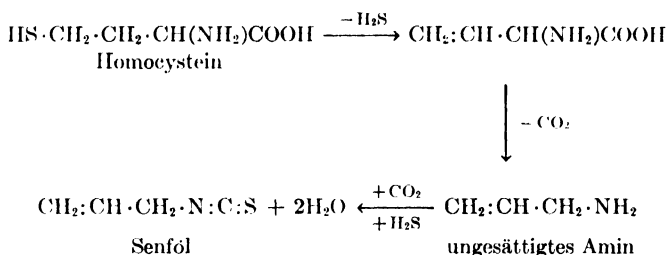
Ueber die Bildung des Ergothioneins ist nichts bekannt. Das Ergothionein des Blutes soll aus der Nahrung stammen. Zeinhydrolysate zeigen die sehr spezifische Thioimidazol-Farbprobe nach Hunter, was auf das Vorkommen von Thiohistidin in Proteinen schliessen liesse.

B. Senföle

In Laucharten, aber auch in manchen Cruciferen kommen neben sogen. Lauchölen, d.h. Mercaptanen und Disulfiden, auch Senföle, Ester der Isothiocyansäure RNCS vor. Der Gehalt an diesen Verbindungen wechselt stark von Pflanze zu Pflanze. Schmidt und Marquardt geben an, dass im Meerrettich 0.1–0.2%, in Zwiebel 0.046% und Knoblauch 0.05–0.009% enthalten sind. Schwefelhaltige Glykoside, die Muttersubstanzen der Senföle und Lauchöle kommen nach Nenjukow bei höheren Pflanzen nur in solchen Familien vor, die auch durch den über der Norm liegenden Gehalt an anorganischem Schwefel ausgezeichnet sind (Krautgewächse). In solchen Familien zeichnen sich dann aber auch alle Vertreter durch einen Gehalt an diesen Stoffen aus. Die Senföle sind Umwandlungsprodukte schwefelhaltiger Aminosäuren. In der Pflanze liegen sie zumeist als Glykoside vor, nur in den Samen ist wohl die Hauptmenge

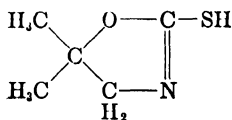
infolge enzymatischer Spaltung als freies Senföl vorhanden. Die Senföle wirken antibiotisch auf gewisse Pilze und stellen daher für die sie enthaltenden Samen einen gewissen Schutz bei der Keimung dar.

Die Bildung von Schwefelwasserstoff aus Cystein und Homocystein in Gegenwart von animalischen Organschnitten ist von Waelsch und Borek beobachtet worden. Möglicherweise verläuft auch in pflanzlichen Geweben ein ähnlicher Abbau. Dann könnte man sich die Bildung der bei den Cruciferen auftretenden Isothiocyanate wie folgt (Challenger und Charlton) erklären:



Die Muttersubstanz des β -Phenyläthylsenföls dürfte Phenylalanin, die des Cheirolins Methionin sein (Barger und Coyne), während Erysolin wohl von dem noch zu entdeckenden Homomethionin stammt.

Im Samen der in Kanada heimischen *Conringia orientalis* entdeckte C. Y. Hopkins nach Entfernung von Fett, Behandeln mit Wasser und Extraktion des wässrigen Auszuges mit Chloroform das 2-Mercapto-5,5-dimethylloxazolin, F. 108.5–109.5°:



Die für eine Substanz pflanzlichen Ursprungs aussergewöhnliche Konstitution liess sich jedoch durch Vergleich mit einer von Bruson und Eastes kurz zuvor synthetisierten Verbindung erhärten. Vermutlich liegt die Verbindung als solche garnicht in der Pflanze vor, sondern ist im Verlauf der Verarbeitung aus β -Methylallylisothiocyanatglucosid entstanden:

leicht löslich in heissem Wasser, die Lösung reagiert kaum basisch. Gibt mit Plumbit bei gelindem Erwärmen PbS. Wurde im Samen des Goldlackes *Cheiranthus cheiri*, sowie einer Abart desselben *Erysinum nanum compactum aureum* nachgewiesen, wo es als Glucosid vorliegt. Es ist das erste in der Natur vorgefundene Sulfon.

δ -Thiocarbimidobutylmethylsulfon (Erysolin), $\text{CH}_3 \cdot \text{SO}_2 \cdot \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{CH}_2 \cdot \text{N} : \text{C} : \text{S}$. Als Glucoerysolin in den Samen des dunkel orangen Goldlackes gefunden (Challenger und Charlton). Verdankt seine Bildung augenscheinlich dem unter den Aminosäuren noch nicht gefundenen Homomethionin.

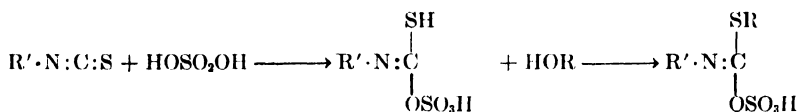
Benzylsenföl, $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{N} : \text{C} : \text{S}$. Kp. 243°. Unlöslich in Wasser. Bildet den Hauptbestandteil des Kapuzinerkressöles (*Tropeolum majus*). Wurde ferner in ätherischen Oel von *Lepidium sativum*, in der Wurzel von *Sisymbrium alliaria*, *Isatis tinctoria*, in den Blättern von *Cardamine pratensis*, im Samen von *Raphanus sativus niger* und *Raphanus sativus radicola* gefunden, wo es wahrscheinlich, z.T. als Glucosid vorliegt.

p-Oxybenzylsenföl, $\text{HO} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{N} : \text{C} : \text{S}$. In Wasser fast unlöslich, mit Wasserdämpfen nur spurenweise flüchtig; leicht löslich in Alkohol, Aether und verdünnten Alkalien. Erzeugt auf der Haut Blasen. Besitzt in der Kälte einen anisartigen Geruch, der in der Wärme stechend wird. Liegt im Samen des weissen Senfes *Sinapis alba* als Glucosid vor.

β -Phenyläthylsenföl, $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH}_2 \text{CH}_2 \cdot \text{N} : \text{C} : \text{S}$, Kp. 255.5–256°. Kommt in den Wurzeln von *Reseda lutea* und *R. luteola*, im ätherischen Oel von *Reseda odorata* L., sowie in *Nasturtium officinale*, *Barbarea praecox* und *Brassica rapa* als Glucosid vor.

Ueber die Bedeutung der Senföle für den Stoffwechsel der sie erzeugenden Pflanzen ist kaum etwas bekannt. Hingewiesen sei auf die von Erna Bach beobachtete Hemmung der spontanen Autoxydation der Ascorbinsäure durch Allylsenföl. Nach 168 Stunden waren bei pH 5.3 in Gegenwart von 51 mg.% Allylsenföl noch 77% des Vitamins C erhalten, während im Kontrollversuch schon nach 24 Stunden die gesamte Ascorbinsäure oxydiert war.

Senfölglycoside. Formal kann man sich durch Anlagerung von Schwefelsäure an die S:C-Doppelbindung der Senföle die Bildung von Thiolschwefelsäureestern in der Pflanze vorstellen, welche mit reduzierenden Zuckern HOR unter Wasserabspaltung Senfölglycoside liefern:



Wie in Wirklichkeit die Bildung verläuft ist jedoch unbekannt.

Die Salze dieser Senfölgucoside sind in der Pflanze zumeist von zwei Fermenten, einer Thioglucosidase und einer Sulfatase (früher wurde das Gemisch beider als Myrosin oder Sinigrinase bezeichnet) begleitet. Beide bewirken die Synthese bzw. hydrolytische Spaltung der Senfölgucoside.

Folgende Senfölgucoside sind zur Zeit bekannt.

Sinigrin, *myrosinaures Kalium*. $\text{CH}_2 \cdot \text{CH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{N} : \text{C}(\text{OSO}_3\text{K}) \cdot \text{S} \cdot \text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$, F. 127° , $[\alpha]_D = +17.6^\circ$, wasserfrei F. 179° . Dieses Glucosid kann aus frisch gepulvertem *Semen sinapis*, dem Samen des schwarzen Senfs, in etwa 1.5% Ausbeute gewonnen werden. Die hydrolytische Spaltung des Sinigrins liefert D-Glucose, das flüchtige Allylsenföl und KHSO_4 .

Sinalbin. $\text{HO} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{N} : \text{C}(\text{—S} \cdot \text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5)(\text{—OSO}_3 \cdot \text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_5 \cdot \text{N}) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. F. 84° (wasserfrei F. $138\text{--}140^\circ$), $[\alpha]_D = -8.23^\circ$. Dieses Glucosid findet sich reichlich im Samen des weissen Senfs, *Semen Erucae*, aus dem es in etwa 2.5% iger Ausbeute gewonnen werden kann. Die enzymatische Spaltung führt zu dem nichtflüchtigen *p*-Oxybenzylsenföl, Glucose und Sinapinsulfat, d.h. dem Sulfat des Sinapinsäureesters des Cholin 3,5-(CH_3O)₂-4-(HO) $\text{C}_6\text{H}_2 \cdot \text{CH} : \text{CH} \cdot \text{CO} \cdot \text{O} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{N}(\text{CH}_3)_3 \cdot \text{HSO}_4$.

Glukocheirolin, $\text{CH}_3 \cdot \text{SO}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{N} : \text{C}(\text{OSO}_3\text{K})(\text{SC}_6\text{H}_{11}\text{O}_5)$. Dieses mit 1 Mol Wasser krystallisierende Glucosid, F. $158\text{--}160^\circ$, $[\alpha]_D = -21.5^\circ$, kann aus Goldlacksamen in etwa 0.8% iger Ausbeute gewonnen werden. Die enzymatische Spaltung liefert das Sulfon Cheirolin, Glucose und Kaliumbisulfat.

Gluconasturtiin liefert bei der Hydrolyse β -Phenyläthylsenföl. Besonders reichlich kommt es im Kraut der frischen Brunnenkresse und im Wiesenschaumkraut vor.

Glucotropäolin gibt bei der Hydrolyse Benzylsenföl.

Glucoerysolin wurde in den Samen des dunkel orangen Goldlackes gefunden (Challenger und Charlton). Es liefert bei der Hydrolyse das Sulfon Erysolin $\text{CH}_3 \cdot \text{SO}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{N} : \text{C} : \text{S}$, ein Homologes des Cheirolins. Die Muttersubstanz dürfte das bisher

noch nicht aufgefundene Homomethionin $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\cdot\text{COOH}$ sein.

Raphanin. Im Zusammenhang mit den Senfölglykosiden sei auf ein antibiotisches Prinzip des Rettigs (*Raphanus sativus*) hingewiesen, das von Ivánovics und Horváth entdeckt worden ist. Aus dem wässrigen Extrakt der Rettigsamen wurde eine farblose bis schwach gelblich gefärbte sirupöse Flüssigkeit $Kp_{0.06}$ 135° , $[\alpha]_D^{20} = 141^\circ$ in Alkohol, von der Zusammensetzung $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{N}_3\text{S}_6$ oder $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{N}_3\text{S}_6$ isoliert. Die Substanz ist sehr leicht löslich in Wasser, Aethanol, Butanol, Butylacetat, Amylacetat und Chloroform, mässig löslich in Aether. Erhitzen mit Silbernitratlösung führt zur Ausflockung von Silbersulfid unter gleichzeitiger Inaktivierung. Nach dem Schütteln mit Barytwasser und Neutralisieren des überschüssigen Alkalis mit Schwefelsäure wird eine inaktive, in Wasser und organischen Lösungsmitteln wenig lösliche, krystalline Substanz, F. $192\text{--}193^\circ$, der vermutlichen Zusammensetzung $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{CNS}_3$ gebildet. Zwischen pH 3 und 8 ist das, Raphanin genannte, Produkt aus Fettig stabil, jenseits dieser Werte wird es rasch verändert. Gegen Hitze ist es äusserst beständig. Das Raphanin zeigt ausgeprägte antibiotische Eigenschaften gegenüber *Staph. aureus*, *Bact. coli*, *Sal. typhi-H*, *Sal. typhi-O*, *Sal. schottmülleri*, *Bact. Shiga-Kruse*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bact. anthracis*, *-subtilis*, *-prodigiosus*. Das Raphanin hemmt ähnlich den Lactonen (Cumarin) die Keimung der Samen verschiedener Pflanzen (*Festuca pratensis*, *Brassica sollaracia*, *Sinapis alba*, *Cucumis sativus*, *Hordeum distichon* u.a.). Von Schmidt und Marquardt, welche verschiedene Kreuzblütler auf ihre antimykotische Wirkung gegenüber *Epidermophyton interdigitale* untersuchten, wurde der Rettich im Gegensatz zu Knoblauch, Zwiebel und Meerrettich als unwirksam bezeichnet.

Antibiotische Verbindung aus Asarum canadense. Aus wildem Ginster (*Asarum canadense* var. *reflexum*) wurden von Cavallito und Bailey in einer Ausbeute von etwa 20 mg. pro Kilogramm frischer Blätter und Stengel zwei antibiotisch stark wirksame Stoffe isoliert. Die eine Substanz ist schwefelhaltig und hat die Zusammensetzung $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_8\text{N}_2\text{S}$; sie krystallisiert aus 95%igem Alkohol in gelben Nadeln und zersetzt sich beim Erhitzen von etwa 160° ab.

Die Isolierung erfolgt durch Behandeln der Blätter mit 95%igem Alkohol. Nach dem Abdestillieren des Alkohols bei 20 mm wurde der wässrige Rückstand zwei mal mit Chloroform extrahiert, das dann

wiederum zwei mal mit 1%iger NaHCO_3 -Lösung ausgezogen wurde. Durch Ansäuern erhält man aus der NaHCO_3 -Lösung eine Verbindung $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_7\text{N}$ als gelbes Pulver. Der Chloroform-Extrakt wurde vom Chloroform befreit, der Rückstand mit 25 ml. Dioxan extrahiert und daraus die obige schwefelhaltige Substanz gewonnen. Zur weiteren Reinigung wurde sie in verdünntem Alkohol gelöst und mit Aktivkohle behandelt.

Die schwefelhaltige Substanz löst sich in Alkohol, Aceton, Chloroform, Essigester, und Dioxan; in Wasser und Benzol ist sie unlöslich. Durch Cystein tritt Inaktivierung ein. Die wässrig-alkoholische Lösung reagiert neutral. Durch Behandeln mit Alkali und Neutralisieren entsteht eine stark grün fluoreszierende Verbindung. In einer Konzentration von 0.06 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ in Alkohol entspricht die Substanz in ihrer Wirkung auf *Streptococcus aureus* einer Osford-Einheit von Penicillin je ml.

V. DIE SCHWEFELHALTIGEN AMINOSÄUREN METHIONIN, CYSTATHIONIN, CYSTEIN, UND CYSTIN

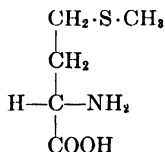
Der Schwefelgehalt sämtlicher pflanzlicher Proteine ist im wesentlichen auf drei schwefelhaltige Aminosäuren zurückzuführen: Cystin, Cystein, und Methionin. In der Familie der Aminosäuren ist—der Reihenfolge der Entdeckung nach—das Cystin das älteste und Methionin das jüngste Kind (Lieben). Man hat lange Zeit aus einer verständlichen Abneigung gegen die übelriechenden niedrigmolekularen flüchtigen Mercaptane die Untersuchung der aliphatischen Schwefelverbindungen vernachlässigt. Die Erforschung des durch brutale Hydrolysenmethoden aus natürlichen Eiweissstoffen herausgeschlagenen geruchlosen Cystins hatte zwar einiges Licht auf die Chemie der biogenen Schwefelverbindungen geworfen. Aber erst die Auffindung des schwefelhaltigen Tripeptids Glutathion in Hefe durch F. G. Hopkins gab einen Anstoss zur intensiven Bearbeitung der Biochemie des Schwefels. Nunmehr ist es klar, dass ohne den Schwefel der Eiweissaufbau nicht denkbar ist, da die Verklammerung der Polypeptidketten nur durch Cystin zu der notwendigen Stabilität führt. Die Aktivität biochemischer Wirkstoffe von Eiweissnatur hängt entscheidend von ihrem Cystin- bzw. Cysteingehalt ab; daher ist die enzymatische Umwandlung der Kohlenhydrate, Proteine und Lipide abhängig von dem durch das Redoxpotential bestimmten Verhältnis von HS- und SS-Gruppen (Bersin). In

manchen Fällen dient das Schwefelatom des Cysteins zur Befestigung prosthetischer Gruppen an Eiweissmoleküle, wie etwa beim Cytochrom c (Theorell). Die Umwandlung des Cysteins bzw. Cystins—welche übrigens verschiedene Wege gehen kann—durch pflanzliche und mikrobielle Enzyme führt zu Wirkstoffen, wie Penicillin, Biotin, und Aneurin. Leider sind weder Zwischenprodukte noch beteiligte Enzyme bekannt. Nicht viel besser ist es um unsere Kenntnisse bezüglich des Abbaus zu anorganischem Sulfid und Sulfat bestellt. Es müssen hier Produkte gebildet werden, deren Wirkung auf die Zelle wir nur vermuten können. So hat Hammett zeigen können, dass unter den Oxydationsprodukten der Thiole sich Inhibitoren des natürlichen Wachstums befinden (vgl. Tocnnyes).

Der Thioäther Methionin mit seinem ziemlich reaktionsträgen Schwefelatom ist von entscheidendem Wert für die Ernährung der Tierwelt, in der die Voraussetzungen für seine Synthese fehlen. Ohne diesen lebensnotwendigen Proteinbaustein ist Wachstum und Erhaltung des N-Gleichgewichtes nicht möglich. Ferner hat sich das Methionin als Methylierungsmittel und als Muttersubstanz der im Stoffwechsel verschiedener niederen Pflanzen gebildeten N-freien Mercaptane und Disulfide erwiesen. Auch die Senföle der Kreuzblütler gehen auf diese Aminosäure bzw. ihre Homologen zurück.

Tierexperimentelle Versuche unter Verwendung isotoper Schwefel- und Stickstoffatome haben gezeigt, dass der Schwefel des Methionins für die Synthese des Cysteins verwendet wird, während das Kohlenstoffskelett des Letzteren vom Serin geliefert wird. Es ist denkbar, dass auch im pflanzlichen Organismus sich ähnliche Vorgänge abspielen.

l.(-)-Methionin, l.(-)- α -Amino- γ -methylthiobuttersäure



F. 267–270°, $[\alpha]_D = -8.1^\circ$. Helianthad des Aethylesters F. 210.5° (Gurin und Segal). Kupfersalz $(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{SNO}_2)_2\text{Cu}$. Dissoziationskonstanten: $pK'a = 9.21$, $pK'b = 11.72$, woraus sich $pH = 5.74$ für den isoelektrischen Punkt ergibt (synthetische D,L-Verbindung).

Das Methionin ist neben dem Cystin bzw. Cystein die Hauptquelle des Schwefelgehalts der Proteine. Da es keinen echten Eiweisstoff gibt, der frei von Schwefel wäre, und in allen bisher geprüften Proteinen Methionin vorkommt, kann angenommen werden, dass Methionin ein obligater Bestandteil von Eiweiss ist. Der durchschnittliche Methioningehalt beträgt 2%, das heisst 50% des Gesamtschwefels bestehen durchschnittlich aus Methioninschwefel. Der restliche Schwefel liegt zumeist als Cystin vor. Auf Grund von Fütterungsversuchen kann angenommen werden, dass das Methionin in quantitativer Beziehung die wichtigste Schwefelverbindung in der Nahrung der Tiere und des Menschen darstellt.

Manche Eiweisskörper enthalten sogar mehr Methionin als Cystin. So hat beispielsweise Lugg die Blattproteine aus *Doctylis glomerata*, *Phalaris tuberosa*, *Medicago sativa*, und *Atriplex nummularium* dargestellt und untersucht. Der Cystin + Cystein-Gehalt betrug 1.1–1.7%, der Methioningehalt 1.2–1.6% des Eiweissstickstoffes. Zahlreiche andere Blatteiweissproben zeigten ähnliche Zahlen. Bei Proteinen aus Gräsern kann die Hälfte des Schwefelgehalts auf Methionin fallen.

Die Proteine von Schimmelpilzen (*Asp. nidulans*, *Asp. oryzae*, *Geotrichum lactis*, *Penicillium flavo-glaucum*, *P. roqueforti* u.a.) scheinen dagegen nach Skinner und Muller arm an Methionin zu sein. Angeblich sollen Algen überhaupt kein Methionin enthalten (Mazur und Clarke).

Die folgende Tabelle nach Toennies unterrichtet über den Methioningehalt einiger pflanzlicher Proteine.

Cytochrom c enthält 3 Mol Methionin/Mol (Theorell).

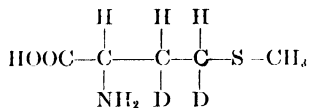
In Erbsen bestehen 0.82% des Gesamteiweissgehaltes aus Methionin (Mazur und Clarke). Qualitativ nachgewiesen ist das Methionin ausserdem in Hefe (Bäckerhefe 1.49%, vgl. Dent), Amandin, Excelsin, Legumin, Phaseolin, Vicilin, Vignin. Das Tuberin der Kartoffel enthält 0.3% Methionin (Slack).

Nach der Hydrolyse von Proteinen findet sich das Methionin meistens mit dem Leucin vergesellschaftet, von dem es nach Takayama und Tsuchiya auf Grund der grösseren Löslichkeit des Methionins in konzentrierter Salzsäure getrennt werden kann. Toennies und F. Kolb isolierten das Methionin aus Proteinhydrolysaten als Quecksilbersalz $\{[\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}^-]_2\text{Hg}\}(\text{HgCl}_2)_4$. Durch starke Schwefelsäure (über 6 N) wird Methionin zu Homo-

METHIONINGEHALT PFLANZLICHER PROTEINE

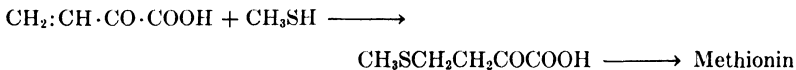
	% Gesamt-S	% Methionin	% von Gesamt-S als Methionin
Adsuki-Bohne, α -Globulin	0.88	2.02-2.37	49-58
Adsuki-Bohne, β -Globulin	0.40	1.22	66
Arachin (Globulin der Erdnuss)	0.42	0.54	28
Kokosnuss-Globulin	1.04	2.05	42
Conavalin (Jackbohne)	0.51	1.81	76
Dieuceumin	1.20	2.78	50
Edestin aus Hanf	0.99	2.39	52
Gliadin	0.99	2.03	44
Glycinin (Sojabohne)	0.84	1.84	47
Hordenin	0.90	2.24	54
Kafirin	0.59	1.61	59
Limabohne, α -Globulin	1.15	2.31	43
Limabohne, β -Globulin	0.35	0.73	45
Monocueumin	1.14	3.04	57
Sativin	1.63	3.93	52
Secalin	1.26	1.51	26
Sorghumin	0.56	1.76	68
Speltin	1.20	2.61	47
Tomatensamen, α -Globulin	0.97	3.14	70
Tomatensamen, β -Globulin	0.79	1.72	47
Zein	1.08	2.58	51

cystin $[\text{HOOC} \cdot \text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S} \cdot]_2$ zersetzt, dessen Deuterium-
verbindung ebenso wie das Dideuteromethionin:



von Patterson und du Vigneaud zu Stoffwechselfersuchen syntheti-
siert wurde. Nach Schoenheimer und Mitarbeitern verliert das
Dideuteromethionin bei ein- bis mehrtägigem Kochen mit 20%iger
Salzsäure oder Schwefelsäure-Bedingungen, wie sie bei der
Hydrolyse von Proteinen gegeben sind—in gewöhnlichem Wasser
infolge geringer Zersetzung nur 6% seines Deuteriums.

Die Art und Weise, wie in der lebenden Pflanzenzelle Methionin
gebildet wird, ist bislang nicht mit Sicherheit bekannt. Nicolet hat
Addition von Methylmercaptan an eine hypothetische Methylen-
brenztraubensäure angenommen:



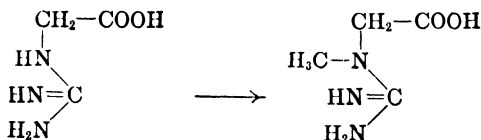
In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass Waelsch und Borek als erste beobachten konnten, dass die aus Methionin durch Nieren- oder Leberenzyme gebildete Ketosäure:



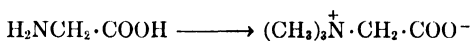
mit heißen Säuren oder Alkalien Methylmercaptan CH_3SH liefert. Wahrscheinlich wird daher das von *S. brevicaulis* gebildete flüchtige Thiol (s.o.) aus Methionin über die Ketosäure entstehen. Die hydrolytische Spaltung der Kohlenstoff-Schwefelbindung in der Ketosäure dürfte eine Oxysäure geben, die unter Wasserverlust in die obige Methylenbrenztraubensäure übergehen könnte.

Von Toennies und Kolb, sowie du Vigneaud und Mitarbeitern wird bezüglich der Methioninsynthese die Möglichkeit erwogen, dass Methylgruppen des Cholins zur Methylierung des Homocysteins $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ herangezogen werden. Das Homocystein, aus dem vielleicht durch Abbau das Cystin gebildet wird, ist in Form des Cystathionins inzwischen aus Proteinhydrolysaten isoliert worden (s.u.).

Andererseits ist von Barrenscheen und von Valyi-Nagy gezeigt worden, dass das Methionin selbst als Methylierungsmittel in der Pflanze dienen kann. In etiolierten Weizenkeimlingen wird die Synthese von Kreatin aus Glykocyamin durch Zusatz von Methionin um das 6–8fache gesteigert:



Es handelt sich um einen obligat aeroben Prozess, bei dem keine Zunahme von Thiolen oder Disulfiden, wohl aber von Sulfat zu beobachten ist. Auch Glykokoll wird in Gegenwart von Methionin methyliert und zwar zu Betain:



Damit dürfte die Genese des Betains zum Beispiel in der Zuckerrübe geklärt sein.

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass nach den Versuchen von Borsook und Dubnoff in der tierischen Leber die gleiche Methylierung von Glykocyamin zu Kreatin durch Methionin erfolgt. Synthetisches Methionin mit eingebautem radioaktivem Schwefel ^{35}S geht im Tierkörper, vermutlich über Homocystein, in Cystin über, in dem nach der Isolierung das ^{35}S nachgewiesen werden konnte (Tarver und Schmidt).

Es ist anzunehmen, dass das Methionin ausser durch Hydrolyse in der Pflanze auch durch Oxydation verändert wird. Bei Anaerobiern, denen die Katalase fehlt, kann infolge Hydrierung des Sauerstoffs durch gelbe Fermente Hydroperoxyd entstehen. Es ist daher von Interesse, dass das Methionin von H_2O_2 sehr leicht in Methioninsulfoxyd:



F. 241–242°, übergeht (Toennies und Kolb, Micheel und Schmitz). Das Sulfoxyd setzt sich mit L-Cystein um nach:

- (1) $\text{MSO} + \text{RSH} \longrightarrow \text{MS} + \text{RSOH}$ (langsam)
- (2) $\text{RSOH} + \text{RSH} \longrightarrow \text{RSSR} + \text{H}_2\text{O}$ (schnell)

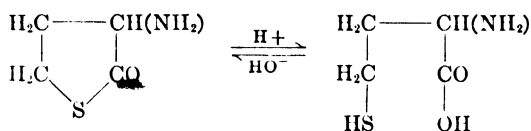
Durch Sulfit wird das Methioninsulfoxyd glatt zu Methionin reduziert. Die Geschwindigkeit der Oxydation durch Hydroperoxyd steigt übrigens in der Reihenfolge: Cystin, Cystein, Methionin.

Synthesen des D,L-Methionins sind mehrfach ausgeführt worden, so 1928 von Barger und Coyne, 1930 von Windus und Marvel, 1936 von Hill und Robson, 1946 von Goldsmith und Tishler (60% Ausbeute), 1947 von Catch, Cook, Graham, und Heilbron, 1948 von Ehrhardt.

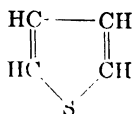
Nach Waelsch, Owades, Miller, und Borek wird das Wachstum von *Lactobacillus arabinosus* in Gegenwart optimaler Mengen von L(+)-Glutaminsäure durch D,L-Methioninsulfoxyd und D,L-S-Benzylhomocysteinsulfoxyd gehemmt; D,L-S-Homocysteinsulfon ist nur halb so wirksam, wie das Sulfoxyd. Unwirksam erwiesen sich D,L-Aethioninsulfoxyd und -sulfon. Die Wachstumshemmung kann durch Erhöhung der Glutaminsäurekonzentration oder Zugabe von Cystein bzw. HS-Glutathion, welche die Sulfoxyde reduzieren, überwunden werden.

Erwähnenswert ist die Beobachtung von Chase und Lewis, wonach

nach Verfütterung von Methionin im Harn der weissen Ratte eine Verbindung auftritt, die mit Nitroprussid und Ammoniak erst nach 7–8 Minuten einen maximalen Farbton gibt, während alle Thiolverbindungen sofort reagieren. Das spricht für das Vorliegen des Homocysteinthiolactons, von dem bekannt ist, dass es in einem pH -abhängigen Gleichgewicht zum Homocystein steht:



Die Ringbildung ist mit einem Verlust der sauren Eigenschaften verbunden. Möglicherweise ist das auch im Pflanzenreich zu vermutende Homocysteinthiolacton die Muttersubstanz des im Kohlen-teer gefundenen Thiophens:

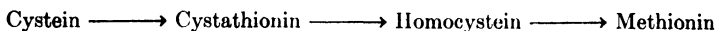


Die Rolle des Methionins als Bakterienwuchsstoff ist noch nicht ganz geklärt. Nachdem sich die ursprüngliche Vermutung des Entdeckers des Methionins Mueller, wonach hämolytische Streptokokken diese Aminosäure benötigen, nicht bewahrheitet hat, wurde von dem gleichen Autor später berichtet, dass die Entwicklung von Diphtheriebakterien in dem Masse beschleunigt werden kann, als Methioninzusatz zu der Kulturlösung erfolgt. Von Hammett ist über eine Wachstumswirkung von D,L -Methionin an der Coelenterate *Obelia geniculata* berichtet worden.

Nach Chaix und Fromageot stimuliert das D,L -Methionin ähnlich wie Cystin und Glutathion den Abbau von Glucose durch Propionsäurebakterien.

Nach Horowitz wurde auf Grund von Stoffwechselfersuchen mit strahleninduzierten Mutanten von *Neurospora*, die zu einer Total-synthese von Methionin nicht fähig sind, gefunden, dass L -Cystathionin ein normales Zwischenprodukt auf dem Wege der Synthese

von Methionin ist. Diese verläuft augenscheinlich nach folgendem Schema:



Jeder dieser Schritte steht unter genetischer Kontrolle.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass nach Lampen, Jones und Mitarbeitern das Wachstum einer Mutante von *E. coli*, welche L-Methionin benötigt, von Norleucin unterdrückt wird; Methionin hebt diese Wachstumshemmung wieder auf.

Wie Challenger und Charlton zeigten, vermag der holzerstörende Pilz *Schizophyllum commune* in Gegenwart von Glucose aus D,L-Methionin nur Spuren von Methylthiol oder Dimethylsulfid zu bilden. Dagegen spaltet *S. brevicaulis* D,L-Methionin glatt zu Methylthiol und Dimethylsulfid; mit S-Methyl-, S-Aethyl-, und S-n-Propylcystein als Substrat wurden die entsprechenden Alkylthiole und Alkylmethylsulfide gebildet. Bereits Akobe hatte berichtet, dass *O. lactis* aus L-Methionin geringe Mengen Methylthiol und Diäthylsulfid (?) zu bilden vermag neben D(+)- α -Oxy- γ -methylthiobuttersäure; *Bacillus subtilis* dagegen desaminiert das L-Methionin zu L(-)- α -Oxy- γ -methylthiobuttersäure:

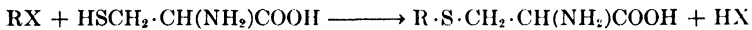


Der Geruch von Seetang ist nach Haas auf Methylsulfid $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ zurückzuführen, das augenscheinlich durch bakterielle Zersetzung des Methionins dieser Pflanzen gebildet worden ist.

L(+)-Cystein/L(-)-Cystin. Unter den in den pflanzlichen Proteinen vorgefundenen schwefelhaltigen Aminosäuren spielt das Cystin und sein Reduktionsprodukt Cystein eine wichtige Rolle.

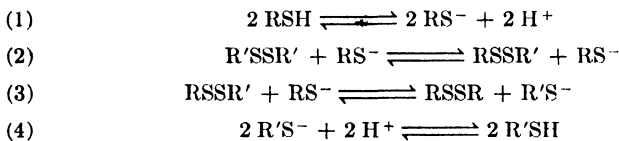
L(+)-Cystein, $\text{HS}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}(\text{NH}_2)\cdot\text{COOH}$. F. 195–198°. Die freie Aminosäure gewinnt man am besten durch Zerlegung des unten beschriebenen Chlorhydrates mit Pyridin (Toennies und Bennett) oder Ammoniak in wässrig-alkoholischer Lösung $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = +9.69^\circ \pm 0.05^\circ$; $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = +7.6^\circ \pm 0.1^\circ$. Cysteinlösungen in Leitfähigkeitswasser zersetzen sich beim Kochen unter Bildung von Cystin, H_2S und NH_3 , gleichgültig ob der Vorgang in Luft oder Stickstoff verläuft. Ausserdem entstehen saure Produkte, welche aus Jodwasserstoff Jod unter Bildung von Cystin freimachen (Cysteinsulfinsäure?). Anders verläuft die Cystinzersetzung (Routh). Von Schöberl und Hornung ist nachgewiesen worden, dass die Zersetzung mit den folgenden beiden Reaktionen beginnt:

gebundenem Cystein hingewiesen werden. Es setzen sich mit Cystein um nach (X Halogen)



folgende Verbindungen (Bersin): Monojod- und Monobromessigsäure, Jodäthylalkohol, Jodacetamid, Alkylquecksilberhalogenide, Chlordinitrobenzol u.a.

Durch Cystein werden die Disulfidbrücken hochmolekularer Proteine (s.u.) reaktiv aufgespalten, so dass Zerfall in niedrigmolekulare Peptide eintritt (Gralén und The Svedberg). Diese Reaktion ist auf eine monomolekulare Umsetzung zurückzuführen, welche über folgende Stufen geht (Bersin und Steudel):



Da zahlreiche Enzyme in der Disulfidform inaktiv sind und erst nach Reduktion zur Thiolform aktiv werden, hat sich Cystein als ein ziemlich allgemeines Aktivierungsmittel erwiesen (Bersin). Ähnlich wie auch andere Thiolverbindungen wirkt Cystein als Aktivator auf folgende pflanzliche Enzyme ein:

Alkoholdehydrase	Lipase
Carboxylase	Milchsäuredehydrase
β -Glucosidase	Papain
Glyoxalase	Pneumokokkenhämolyisin
Hefeproteinase	Proteinase von <i>Cl. histolyt.</i>
Kohlensäureanhydrase	Weizenproteinase

Enthemmend wirkt Cystein auf die durch Ascorbinsäure gehemmte β -h-Fruktosidase (Weidenhagen und Lu).

Infolge Proteasenaktivierung wirkt injiziertes Cystein zerstörend auf die durch *Phytomonas tumefaciens* hervorgerufenen Gallen bei Pelargonien und Sonnenblumen (Ark).

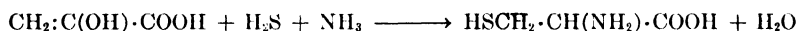
Cystein kann in den im allgemeinen O_2 -freien Zellen durch Cytochromoxydase zu Cystin oxydiert werden (McAnally und Mitarbeiter).

Zu beachten ist der von Runnström und Sperber erhobene Befund, wonach Cystein bei Bäckerhefe eine starke aerobe Gärung hervorruft; augenscheinlich handelt es sich um eine Permeabilitätserhöhung der

Zellwände infolge oxydoreduktiver Umsetzung mit deren Proteinen. In diesem Zusammenhang sei auf die von Califano gefundene Erhöhung der Glykolyse durch *Coli* bakterien in Gegenwart von Cystein hingewiesen. Aehnliches beobachteten Chaix und Fromageot bei Propionsäurebakterien. Nach Mezzadrolì und Vicentini hemmt Cystein das Wachstum und fördert die Gärung der Hefe, während Cystin eine Stimulation der Zellvermehrung bewirkt. Man sieht, dass Cystein und Cystin trotz ihrer nahen chemischen Verwandtschaft biologisch ganz verschieden wirken können, was auch im tierischen Stoffwechsel beobachtet worden ist.

Der Stoffwechsel des Cysteins in der Pflanze ist nur wenig untersucht worden. Da diese Aminosäure eine sehr reaktionsfähige Verbindung ist, die mit den verschiedenen Produkten des intermediären Stoffwechsels (Carbonylverbindungen, Äthylenderivate) zu reagieren vermag, sammelt sie sich als solche in der Pflanze nicht an. Wir finden sie zumeist in Folge peptidatischer Synthese gebunden in den Peptiden und Proteinen.

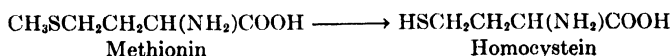
Das Dreikohlenstoffgerüst des Cysteins entstammt augenscheinlich der Brenztraubensäure, die in ihrer Enolform unter Addition von Schwefelwasserstoff und Ammoniak formal Cystein liefern kann:



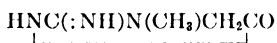
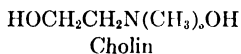
Diese Synthese verläuft über das Serin (s.u.), welche Fermente dabei beteiligt sind, ist jedoch nicht bekannt. Es muss auch die Möglichkeit erwogen werden, dass das Cystein ein Abbauprodukt des Methionins ist. Stoffwechseluntersuchungen am Tier und am Menschen haben jedenfalls einen Zusammenhang mit den Umsetzungen des Methionins aufgedeckt (Brand, Block, und Cahill).

Es hat sich gezeigt, dass zur Erhaltung des Stickstoffgleichgewichts und zur Sicherung des Wachstums junger Tiere das Cystin der Nahrung vollständig durch Methionin ersetzt werden kann. Wenn Ratten mit Methionin gefüttert werden, das radioaktiven Schwefel ^{35}S enthält, so lässt sich in dem aus den Proteinen der Tiere isolierten Cystin das radioaktive Isotop nachweisen (Tarver und Schmidt, du Vigneaud und Mitarbeiter). Weitere Versuche haben gezeigt, dass im Tierkörper der Prozess der Umwandlung von Methionin in Cystein in drei Stufen erfolgt:

(1) Zunächst wird Methionin zu Homocystein entmethyliert:

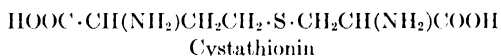
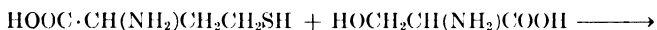


Werden die Methylgruppen des Methionins durch Deuterium markiert, so lässt sich nach Verfütterung eines derartigen "schweren" Methionins der schwere Wasserstoff in den Methylgruppen von Cholin, Kreatin und Kreatinin:



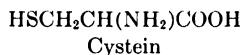
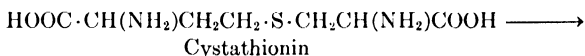
nachweisen (du Vigneaud und Mitarbeiter). Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die Methylgruppe des Methionins für den Aufbau des Cholins der Esterphosphatide eine entscheidende Rolle spielt. Der Vorgang wird als "Transmethylierung" bezeichnet.

(2) Das gebildete Homocystein reagiert unter Wasserabspaltung mit Serin, wobei Cystathionin gebildet wird:



Die Bildung dieses Thioäthers wurde in Gegenwart von Schnitten aus Rattenleber nachgewiesen. Für die Synthese spricht ferner ein Versuch, bei dem mit "schwerem" Stickstoff markiertes Serin an Ratten verfüttert wurde; das aus dem Gewebe der Ratten isolierte Cystin zeichnete sich durch einen hohen Gehalt an "schwerem" Stickstoff aus (Stetten).

(3) In der letzten Stufe wird schliesslich das Cystathionin durch ein in der Leber nachgewiesenes Enzym, welches ein Metallion (Zink oder Magnesium) sowie Adenosintri-phosphat als Coenzym benötigt, zu Cystein aufgespalten:



Das andere Spaltprodukt der Reaktion scheint eine phosphorylierte Oxyaminosäure zu sein (Binkley, Anslow, und du Vigneaud).

Der Ersatz der Hydroxylgruppe des Serins durch die Thiolgruppe des Homocysteins ist schliesslich von du Vigneaud, Kilmer, Rachele, und Cohn in besonders überzeugender Weise für den Tierkörper

nachgewiesen worden. Es wurde ein Methionin synthetisiert, welches einerseits durch radioaktiven Schwefel und andererseits durch isotope "schweren" Kohlenstoff markiert war. Das aus dem Haar der damit gefütterten Tiere isolierte Cystin enthielt etwa 80% des radioaktiven Schwefels jedoch keine nennenswerten Mengen "schweren" Kohlenstoffs. Daher musste also der Schwefel des Cystins aus dem Methionin stammen, dagegen war das Kohlenstoffskelett von dem Serin geliefert worden. Es ist zu hoffen, dass eines Tages mit Hilfe dieser modernen Methode der Verwendung markierter "Leitatome" auch der Stoffwechsel des Cystins in der Pflanze aufgeklärt werden wird.

Beachtenswert ist die Fähigkeit des Cysteins analog dem Heteroauxin und dem Aneurin das Wachstum von cambialem Gewebe bei *Salix caprea in vitro* anzuregen. Vielleicht handelt es sich um eine spezifische Aktivierung einer Proteolyse, bei der ein peptidartig gebundener Wuchsstoff freigesetzt wird.

Es ist ferner bekannt, dass mit Aminosäuregemischen, welche Cystein enthalten, die Keimung von *Phaseolus vulgaris albus* sehr gefördert werden kann.

L-Cysteinmonochlorhydrat, $C_3H_7O_2NS \cdot HCl \cdot H_2O$. Nadeln. Wird durch Reduktion von Cystin auf katalytischem Wege in Gegenwart von Pd mit Wasserstoff oder mittels Zinn und Salzsäure dargestellt (vgl. Schöberl). Ein neueres elegantes Verfahren beruht auf der Hydrierung von Cystin mittels metallischem Natrium in flüssigem Ammoniak, Abdampfen des Ammoniaks und Umkrystallisieren aus 5 N Salzsäure. Getrocknet über Diphosphorpentoxyd bei gewöhnlichem Druck und Zimmertemperatur und zur Entfernung von Schwermetallspuren mehrmals gut mit Aceton durchgerührt, halten sich die Krystalle unbegrenzt. Im Hochvakuum über P_2O_5 verliert das Chlorhydrat 1 Mol H_2O . Die wässrige Lösung zeigt ein pH von etwa 2.1. Bei der Jodtitration erhält man richtige Resultate—d.h. keine Oxydation über die Disulfidstufe hinaus—nur in stark salzsaurer, essigsaurer oder absolut alkoholischer Lösung.

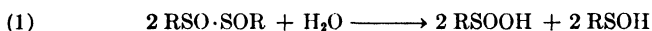
Das Redoxpotential des Systems Cystein/Cystin bei pH 7.0 liegt bei 0.39 Volt (F. G. Fischer). Bei diesem System ist wie bei anderen niedermolekularen Ueberträgern biologischer Oxydoreduktionen die in ihrem Diffusionsvermögen begründete Fähigkeit zur Verknüpfung räumlich isolierter Fermentsysteme eine der Voraussetzungen ihrer katalytischen Wirkung. Wegen der Schwerlöslichkeit des Disulfids

Cystin spielt in den pflanzlichen Geweben allerdings das Stoffpaar Cystein/Cystin bei weitem nicht die überragende Rolle, wie das leicht wasserlösliche SH/SS-Glutathion (s.u.).

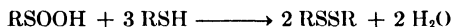
Im Folgenden sind einige in den letzten Jahren bekannt gewordenen Oxydationsprodukte des Cysteins bzw. Cystins aufgeführt, da diese möglicherweise im intermediären Stoffwechsel eine Rolle spielen.

Cysteinsulfensäure, Sulfoxycystein, $\text{HOOC} \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{CH}_2\text{SOH}$. Als Sulfat mit 1 oder 2 H_2SO_4 bei der Oxydation des Cystinperchlorats mit Sulfomonopersäure von Toennies in isoamylalkoholischer Lösung erhalten. Es zeigt keine saueren Eigenschaften, sondern fungiert als Base.

Cysteinsulfinsäure, $\text{HOOC} \cdot \text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{SOOH}$. F. $152\text{--}153^\circ$ (korr., Zers.), $[\alpha]_{\text{Hg}}^{27-28} = +33.4^\circ$ in N HCl, $+11^\circ$ in Wasser. Natrium-Salz, $[\alpha]_{\text{Hg}}^{25} = +10.9^\circ$ (Lavine). Entsteht aus Cystindisulfoxid beim Stehen der wässrigen Lösung nach:



Wird von Jodwasserstoff zu Cystin, also dem Disulfid, reduziert. Cystein reagiert mit der Cysteinsulfinsäure nach:



unter Bildung von Cystin.

Cysteinsäure, $\text{HOOC} \cdot \text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2 \cdot \text{SO}_3\text{H}$. Durch Oxydation von Cystin mit Bromwasser oder mittels H_2O_2 in Gegenwart von Vanadinsäuresol (Ghosh und Kar). Auch ein Gemisch von konzentrierter Salzsäure und der zehnfachen Menge 1%iger HJO_3 (Denigés) eignet sich zur Oxydation von Cystin zu Cysteinsäure.

L(-)-Cystin, $\text{HOOC} \cdot \text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{SSCH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$. Zersetzungspunkt $258\text{--}261^\circ$. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -224^\circ$, $[\alpha]_{546}^{15} = -306^\circ$. Krystallisiert in sechseckigen Plättchen oder seltener in langen hexagonalen Prismen (Greenstein). Löslichkeit: 1:9000 in Wasser bei 17° , 0.045 T. in 100 T. Wasser von 70° . Die isoelektrische Zone liegt bei pH 3–7 (Abramson und Moyer).

Cystin ist unlöslich in Alkohol und Aether, leicht löslich in Ammoniak und Alkalicarbonaten, dagegen nicht in Ammoncarbonat. In Mineralsäuren und Oxalsäure löst es sich, in Essigsäure oder Weinsäure nicht. Das durch 12–15-stündiges Erhitzen von L-Cystin mit

der 15–20-fachen Menge Salzsäure (1.124) auf 165° erhaltene D,L-Cystin ist in Wasser (0.006 T. in 100 T. Wasser) noch weniger löslich; es krystallisiert in langen, oft zu Büscheln vereinigten Nadeln wie Tyrosin oder in langen, schmalen Blättchen; mittels Enzymen aus *Aspergillus niger* kann die L-Komponente zerstört und nicht ganz reines D-Cystin gewonnen werden (Neuberg und Mayer). Bezüglich der Derivate sei auf Hoppe-Seyler/Thierfelder verwiesen. Das Lithium-Salz bildet leicht übersättigte Lösungen (Toennies und Lavine). Ueber die Löslichkeit des L-Cystins in Salzlösungen berichteten McMeekin, Cohn, und Blanchard. Die beste Methode zur Darstellung des Cystins aus Rosshaar, Hornspänen, Schweineborsten, Menschenhaar oder Wolle ist die von Weidinger. Eine ausgiebige Synthese wurde von Wood und du Vigneaud beschrieben. Das zur Reinigung des Cystins oft benutzte Chlorhydrat wird in wässriger Lösung leicht hydrolytisch gespalten, wobei Cystin ausfällt.

In den folgenden Tabellen finden sich einige Angaben des Cystin-gehalts verschiedener pflanzlicher Materialien:

I. CYSTINGEHALT IN PFLANZENSUBSTANZEN NACH H. BENISCHKE (1948)

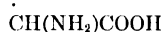
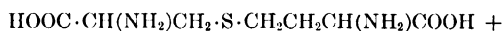
	Gesamt-N, %	Protein-N, %	Nicht- protein-N, %	Cystin, %	Cystin-N, %	Cystin-N in % vom Gesamt-N, %
Erbsen...	3.26	2.83	0.43	0.15	0.017	0.52
Saubohnen.	4.26	3.70	0.56	0.09	0.010	0.24
Mais...	1.60	1.46	0.14	0.08	0.009	0.56
Weizenkorn	1.90	1.64	0.26	0.09	0.010	0.53
Gerstenkorn	1.71	1.46	0.25	0.08	0.009	0.53
Haferkorn.	1.44	1.16	0.28	0.12	0.014	0.97
Roggenkorn.	1.64	1.39	0.25	0.06	0.007	0.43
Kartoffeln.	1.10	0.61	0.49	0.04	0.005	0.45
Luzerne..	2.98	1.56	1.42	0.05	0.006	0.20
Weizenstroh	0.40	0.25	0.16	0.04	0.005	1.25
Gerstenstroh	0.37	0.21	0.14	0.12	0.014	3.79
Haferstroh..	0.24	0.15	0.10	0.11	0.013	5.42

Die Bestimmungen wurden an Hydrolysaten der extrahierten Globuline, Prolamine und Gluteline nach Sullivan durchgeführt und ergeben daher niedrigere Werte, als die Analysen der Gesamtsubstanz der folgenden Tabelle.

TABELLE II

	% Cystin	Autoren
Kartoffelwei3	4.4	K6nig
Tuberin d. Kartoffel	2.1	Slack
Papain	3.2	Kassell, Brand
Prolamin aus <i>Moringa pterigosperma</i>	2.20	Rau, Ranganathan
Gliadin	2.18	Folin, Marenzi
Weizen	1.8	<i>Nutrition Abstracts</i> , Block
Enzyme		
Kohlensureanhydrase	1.3	Scott, Mundive
Pepsin, krystallisiert	1.4-1.5	Sullivan, Goldberg
altes gelbes Ferment	0.34	Kuhn, Desnuelle
Maiskeimling	1.8	<i>Nutrition Abstracts</i>
Maiskorn, ganz	1.5	<i>Nutrition Abstracts</i>
Erdnussglobulin	1.42	Kotasthane, Narayana
Erbssamenprotein	0.81-1.42	Kurgatnikow
Edestin	1.18	Stern, Beach, Macy
Peteh-Bohnen (<i>Parkia speciosa</i>)	1	Van Veen
Glyzinin (Soja-Bohne)	0.74-1.46	Csonka, Jones
Maismehlk6rper	1.1	<i>Nutrition Abstracts</i>
Zein	1.0	<i>Nutrition Abstracts</i>
Proteinpolysaccharid aus Ricinusbohnen	5.0	Spies, Coulson
Bäckerhefe	0.6	Dent
Leinensamen	1.9	Block, <i>Advances in Protein Chemistry</i> , 1945
Hafer	1.8	Block

Von Horn und Jones wurde 1940 aus giftigem Weizen, der auf selenhaltigem Boden gewachsen war, ein vermutlich isomorphes Gemisch, Prismen vom Zers.P. 263-265°, des Cystathionins und des entsprechenden Selenids isoliert:



VI. SCHWEFELHALTIGE PEPTIDE UND PROTEINE

Unter den in der Pflanze ubiquitär aufgefundenen schwefelhaltigen Peptiden befindet sich eines, das in Beziehung zu zahlreichen Fermentreaktionen steht: das Glutathion. Es soll gesondert besprochen werden.

Ihm gegenüber stehen die sonstigen aus Aminosäuren aufgebauten Peptide, welche als Wirkstoffe oder Gifte in einzelnen Pflanzen gebildet werden, bzw. deren Funktionen uns derzeit noch unbekannt sind: Viscotoxin, Phalloidin, Amanitin.

Die schwefelhaltigen Proteine pflanzlicher Herkunft sind bisher sehr stiefmütterlich behandelt worden. Die Virusproteine sowie der Kleber des Weizens seien hier herausgegriffen, weil bei ihnen, ähnlich wie bei den im nächsten Kapitel behandelten katalytisch wirksamen schwefelhaltigen Proteinen die Eigenschaften ganz auffällig von ihrem Schwefelgehalt bestimmt werden.

Zunächst sei darauf hingewiesen, dass wir heute nach Chibnall (1942) einen scharfen Unterschied zwischen Polypeptiden und Proteinen machen müssen. Polypeptide sind Ketten säureamidartig, verbundener α -Aminosäuren, welche sich lediglich bei der Krystallisation zu Netzbausteinen zusammenlagern. Proteine dagegen sind aus einer bestimmten Zahl von Peptidketten (beim Edestin z.B. 6) hauptvalenzmässig aufgebaute höhermolekulare Gebilde, in denen die Zusammensetzung der Peptidketten im einzelnen Molekül vielleicht nicht in jedem Falle gleich zu sein braucht. Proteine sind also nicht besonders hochmolekulare Peptide, sondern durch Schwefelbrücken aus Peptiden aufgebaute höhere Einheiten. Weiterhin sei darauf aufmerksam gemacht, dass Proteine unter bestimmten Bedingungen zu "Supermolekülen" zusammentreten können, wie sie z.B. im Tabakmosaikvirus mit einem Molekulargewicht von etwa 40 Millionen vorliegen. Dieses Virus besteht nach Schramm aus kleinen Proteinbausteinen bis herunter zum Molekulargewicht 120,000, welche innerhalb des Gesamtmoleküls wieder zu bestimmten Gruppen zusammengefasst sind. Die Festigkeit dieser Bindungen ist abgestuft, so dass etwa unter der Wirkung von Hydroxylionen zunächst die grösseren Verbände von einander getrennt werden und diese schliesslich weiter zerfallen.

Zwischen den Ketten der Polypeptide in den Proteinen bestehen Querverbindungen (Sprossen, Roste). An der Ausbildung dieser Brückenbindungen ist das Cystin mit seiner —S—S—Gruppe beteiligt, indem es gleichzeitig zwei Peptidketten angehört. Diese Querverbindungen können hydrolytisch, oxydativ oder reduktiv (vgl. Cystin) gespalten werden, wobei ein Zerfall zu Peptiden eintritt. Ferner bestehen neben Wasserstoffbindungen auch salzartige Ionenbeziehungen zwischen den basischen Gruppen der Diaminosäuren

und räumlich günstig gelegenen Carboxylgruppen der Dicarbonsäuren.

Die Hydrolyse von krystallisierten Proteinen einheitlicher Zusammensetzung und die quantitative Bestimmung der Aminosäuren ist in den letzten Jahren so weit vervollkommen worden, dass die Aufstellung empirischer Formeln, welche natürlich nichts über die Reihenfolge der Bausteine aussagen, möglich ist (Brand, Sidel, Goldwater, Kassell, und Ryan).

Beispielsweiss hat das krystallisierte β -Lactoglobulin von der Summenformel $C_{1864}H_{3072}N_{468}S_{21}O_{576}$ folgende empirische Zusammensetzung (die Aminosäuren werden durch die zwei oder drei ersten Buchstaben symbolisiert):

Gly₄Ala₂₉Val₂₁Leu₅₀Isoleucin₂₇Pro₁₅Phe₉CySH₄(CyS—)₈Met₉Try₉

Arg₇His₄Lys₃₃Asp₃₆Glu₂₄(Glu—NH₂)₃₂Ser₂₀Thr₇₁Tyr₆(H₂O)₄

Eine Zusammenstellung der natürlichen Aminosäuren in übersichtlicher Tabellenform hat Toennies durchgeführt.

Die verschiedenen Testsubstanzen zur spezifischen Lösung der drei Arten von Querverbindungen zwischen den Peptidketten in Proteinen seien hier ebenfalls tabellarisch dargestellt (vgl. Zahn):

Bindung	Massgebende Gruppe	Testsubstanz
Disulfidbrücken	Cystin	Reduktion: Thiole, Cyanid, Sulfit Hydrolyse: Alkalien Oxydation: Persäuren
Wasserstoffbrücken	(a) Hauptkette: Peptidgruppen (b) Seitenketten: Oxy- und Säureamidgruppen	Phenole, Formamid, Wasser
Salzbrücken	Diaminomonocarbonsäuren, Monoaminodicarbonsäuren	Wasserstoff- und Hydroxylionen (Faltung und Entfaltung der Peptidketten durch pH-Aenderung)

Aus der Peptidkette herausragende Cysteinylreste sind die Ursache für das Auftreten der sogenannten "fixen" HS-Gruppen. Disulfid- und Thiolgruppen können sich unter geeigneten Bedingungen intra- oder intermolekular durch Oxydoreduktion umsetzen, wodurch neue Kettenanordnungen, Aggregationen, und Desaggregationen eintreten

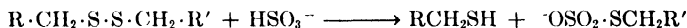
können, welche mit einer Aenderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Proteine verbunden sind. Die Disulfidbindungen von Polypeptiden und Proteinen werden in Abhängigkeit von benachbarten Substituenten mit zunehmender Temperatur schon durch Wasser nach:



gespalten (Schöberl'sche Reaktion). Oberhalb $\text{pH} = 10$ kann schon eine Hydrolyse bei Zimmertemperatur stattfinden. Bei der Denaturierung von Proteinen durch Hitze, Säuren, Alkalien, Alkohol, Harnstoff, Guanidiniumsalze, Salicylat, und Ultraviolettbestrahlung können HS-Gruppen nachweisbar werden, die im nativen Molekül entweder maskiert waren oder fehlten. Hochmolekulare Thiolproteine gehen durch Behandlung mit niedrigmolekularen Disulfiden in hochmolekulare Disulfide über; aber auch der umgekehrte Vorgang kann eintreten; beide Reaktionen lassen sich quantitativ verfolgen.

Die reaktionsfreudige HS-Gruppe der Thiolproteine bildet (1) Mercaptide mit Schwermetallsalzen, wird (2) durch Oxydationsmittel in die Disulfid-, Sulfoxyd-, Sulfon- und Sulfosäuregruppe verwandelt, bildet (3) Thioäther durch Anlagerung an aktive $\text{CC}=\text{C}$ - und CO -Doppelbindungen oder Umsetzungen mit Verbindungen, wie Monojodacetat und Jodacetamid, die ein aktives Halogen enthalten. Durch derartige Reaktionen können Nachbargruppen im Molekül in ihrer Reaktionsfähigkeit verändert werden, was z.B. in einer Aenderung der katalytischen Aktivität zum Austruck kommen kann.

Im Hinblick auf die nachgewiesene Bildung von Sulfit im intermediären Stoffwechsel des Schwefels in der Pflanze sei auf die reduktive Aufspaltung der Disulfidspalten in Proteinen hingewiesen. Es entstehen dabei Thiol- und Thiosulfosäuregruppen:



Der Charakter der entstehenden Spaltprodukte hängt ab von der Art und Zahl der polaren bzw. unpolaren Seitenketten (Lindley und Phillips). So reagiert Cystinyldiglycin schneller als Cystin.

Bemerkenswert ist auch die Aenderung der Reaktionsfähigkeit von Säureamidgruppen in Nachbarschaft zum Cystein bzw. Cystin. Von Harington und Rivers konnte gezeigt werden, dass Dipeptide aus Tyrosin und Cystein bzw. Cystin von krystallisiertem Pepsin gespalten werden, und zwar wird das cysteinhaltige Peptid besser gespalten, als sein Oxydationsprodukt. Diese Beobachtung erklärt die schon

bekannte Tatsache, wonach denaturierte Proteine, welche im Gegensatz zu den nativen Thiolgruppen aufweisen, von Pepsin besser angegriffen werden. Wahrscheinlich greift das Pepsin die Cystein-Tyrosin-Bindung in Proteinen unter Freilegung von Tyrosin an.

Die bekannte Hemmung der Sakaguchi-Reaktion in Guanidylproteinen ist auf eine Beeinflussung der Reaktionsfähigkeit der Guanidinogruppen durch benachbarte Thiol- und Disulfidgruppen zurückzuführen (Roche und Mourgue).

Es ist damit zu rechnen, dass die Disulfidspalten der Proteine bei der Wirkung von ultravioletter Strahlung auf Eiweisskörper eine Rolle spielen. Alle Eiweisskörper weisen eine mehr oder weniger hohe UV-Empfindlichkeit auf, vor allem in Lösung. Wird eine kolloidale Proteinlösung der UV-Strahlung ausgesetzt, so zeigt sie nach einer gewissen Zeit merkliche Trübung, der eine Ausflockung des koagulierten Proteins aus der Lösung folgt. Man unterscheidet drei Stadien der Strahlenreaktion des Eiweisses: (1) Denaturierung des Proteinmoleküls nach Massgabe der Absorptionskurve, wobei die hydrolytische Bildung von Thiolgruppen mit nachfolgender Zersetzung der daneben entstandenen HOS-Gruppen (vgl. Bersin) unter Schwefelwasserstoffentwicklung bedeutsam erscheint; (2) Koagulation des unter Entfaltung denaturierten Eiweissmoleküls, die in Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel stattfindet; und (3) Ausflockung des koagulierten Proteins, bei der ebenfalls das Lösungsmittel eine gewisse Rolle mitspielt. Der Koagulationsvorgang verläuft wellenförmig und weist eine je nach der angewandten Dosis mehr oder weniger grosse Latenzzeit auf. Die Denaturierung des Eiweisses ist im Gegensatz zu dem Koagulationsvorgang temperaturunabhängig. Es handelt sich dabei um einen echten photochemischen Prozess (Rajewski). Vermutlich ist die Wirkung radioaktiver Strahlung in ähnlicher Weise aufzufassen. Die Strahlungsempfindlichkeit der Proteine ist die Ursache der Empfindlichkeit von Bakterien und anderen Einzellern gegenüber der UV-Strahlung.

A. Schwefelhaltige Polypeptide

Glutathion. Das Tripeptid Glutathion gehört zu denjenigen schwefelhaltigen Verbindungen in der Pflanze, die dank ihrer grossen Reaktionsfähigkeit erst spät isoliert und untersucht werden konnten. Man war schon lange auf der Suche nach Stoffen, die unmittelbar mit dem Sauerstoff der Luft unter sogenannten "physiologischen"

Bedingungen reagieren. Als erster hat de Rey-Pailhade 1888 beobachtet, dass diejenigen Gewebe, die am meisten Sauerstoff absorbieren, auch in besonderem Masse befähigt sind, mit elementarem Schwefel bei Zimmertemperatur unter Bildung von Schwefelwasserstoff zu reagieren. Er vermutete daher, dass u. a. zum Beispiel in der Bierhefe ein Stoff, Philothion, enthalten ist, der als Wasserstoff- oder wie wir heute sagen würden, als Elektronenüberträger eine wesentliche Rolle bei der Gewebsatmung spielt. Später hat dann Heffter gezeigt, dass viele monosubstituierte Abkömmlinge des Schwefelwasserstoffs, wie etwa das Cystein, als Redoxsysteme des Gewebes fungieren können.

Es ist eine der wichtigsten Erkenntnisse der modernen Enzymforschung, dass sowohl Redoxasen, als auch verschiedene Hydrolasen Systeme von Redoxkatalysatoren mit abgestuftem Potential und individueller Reaktionsfähigkeit darstellen (Bersin). Ebenso wie die optimale Säurestufe ist daher auch das optimale Redoxpotential eine zur Charakterisierung vieler Enzyme unerlässliche Grösse.

Beim Zusammentreffen zweier Redoxsysteme findet unter Voraussetzung einer genügend grossen Reaktionsgeschwindigkeit ein Elektronen-, eventuell auch Protonenaustausch statt. Diesen Vorgang bezeichnen wir als Oxydoreduktion.

Betrachtet man beispielsweise die Umsetzung zwischen Eisen-(3)- und Titan-(3)-ionen in saurer Lösung nach:



so lässt sich unschwer erkennen, dass hierbei nicht positive Ladungen gewandert sind, sondern dass ein Elektron vom Titan-(3)-ion auf das Eisenion übertragen worden ist. Im Gefolge dieser Reaktion ist dreiwertiges Titan zum vierwertigen oxydiert worden und es hat eine Reduktion des dreiwertigen Eisens zum zweiwertigen stattgefunden. Man kann beide Lösungen in getrennten Gefässen einmal leitend durch eine elektrolythaltige Brücke, zum anderen mittels unangreifbarer Elektroden über einen Stromanzeiger verbinden. Man beobachtet in solch einem Falle das Auftreten eines elektrischen Stromes mit einem charakteristischen Potential. Nun ist es prinzipiell nicht möglich, absolut reines Titan-(3)-salz bzw. Eisen-(3)-salz herzustellen. Daher benutzt man in der Praxis zur Messung der Redoxpotentiale Lösungen, die je 50% der oxydierten und reduzierten Form des jeweiligen Reaktionsteilnehmers enthalten. Die Lösungen

solcher Redoxsysteme lassen sich leicht herstellen, und das erhaltene Potential unterliegt kaum merklichen Schwankungen. Das Redoxpotential ist abhängig von der Wasserstoffionenkonzentration und der Temperatur. Als Bezugssystem gilt die Platin-Wasserstoff-Elektrode.

Nun ist öfters die Potentialdifferenz zwischen zwei koexistierenden biologischen Redoxsystemen vorhanden, allein es findet doch kein Elektronenaustausch statt, da die Reaktionsgeschwindigkeit zu klein ist. So wird reines Cystein von Sauerstoff kaum oxydiert (Warburg). Schaltet man aber einen geeigneten Redoxkatalysator als Elektronenüberträger dazwischen—beispielsweise das System Kupfer-(1)/Kupfer-(2) mit dazwischen liegendem Potential—so findet eine ausserordentliche Reaktionsbeschleunigung statt, mit andern Worten: Kupferionen katalysieren die Autoxydation des Cysteins.

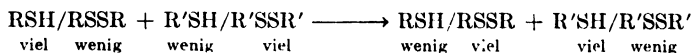
Genau wie das Kupfersystem wirken auch die verschiedensten biologischen Katalysatoren der Oxydoreduktion, die Redoxasen. Nur dass hier nicht nur ein reversibles Redoxsystem, sondern fast immer eine ganze Kette zur Unterteilung der freiwerdenden Energie zwischen dem Reduktionsmittel und dem Oxydationsmittel eingeschaltet zu sein pflegt. Das negativste reversible Redoxsystem mit kleinster "Beschwerung" (wie man in Analogie zur Pufferung die Möglichkeit zur Einschränkung der Potentialschwankungen bezeichnet) bestimmt dann in einem abgeschlossenen Raum (Zelle, Leitungsbahnen) das Potential.

Von der Negativität des Potentials in der Zelle, im Gewebe oder im Organ hängt das Optimum des intermediären Stoffwechsels ab. In beschränkter Masse können niedrigmolekulare Hilfskatalysatoren, wie Ascorbinsäure oder das Glutathion eine durch Mangel entstandene Positivierung des Redoxpotentials rückgängig machen. Der intermediäre Stoffwechsel ist aber ohne eine genügende Konzentration der ihn in Gang haltenden Enzyme nicht denkbar. Eine genaue Kenntnis der Redoxpotentiale der Thiol-Disulfid-Systeme von der Art des Glutathions (vgl. Preisler und Berger) verdanken wir erst neueren Arbeiten.

Das Studium der Bedeutung der Thiol-Disulfid-Systeme für die Aktivität biochemischer Wirkstoffe (Bersin) hat die Abhängigkeit auch der Hydrolasen vom Redoxpotential aufgedeckt. Esterasen, Carbohydrasen, und Proteasen erwiesen sich in ihrer Aktivität gebunden an ziemlich enge Grenzen des Redoxpotentials. Es ist

daher verständlich, dass der Fett-, Kohlenhydrat- und Proteinumsatz an die Konzentration der reversiblen Redoxsysteme katalytischen Charakters in den Zellen der verschiedenen Pflanzen gebunden ist. Eine Negativierung beschleunigt im allgemeinen die Hydrolyse, eine Positivierung die Synthese. Bei Sauerstoffmangel gehen Abbauprozesse leichter vor sich als bei Luftzutritt.

Die Umsetzung zweier Thiol-Disulfid-Systeme nach:



gehören dem Massenwirkungsgesetz. Ist also die Konzentration eines niedrigmolekularen Thiols, z.B. Glutathion, wesentlich grösser, als die eines hochmolekularen Disulfids, z.B. eines Proteins, so findet eine Reduktion des Letzteren im entgegengesetzten Falle eine Oxydation des Ersteren statt. Binet und Weller haben mit Recht darauf hingewiesen, dass man mit gutem Grund im allgemeinen innerhalb einer lebenden Zelle eine gegenüber den "fixen" Disulfid-Gruppen grössere Konzentration des reduzierten Glutathions anzunehmen hat. Die bemerkenswerte Zähigkeit, mit der die lebende Pflanze ihre Glutathionreserven festhält und der Einfluss von Glutathion auf die an ein bestimmtes Redoxpotential gebundene Richtung der enzymatischen Aktivität lassen vermuten, dass diesem Tripeptid eine bestimmte Rolle bei den assimilatorischen und dissimilatorischen Vorgängen zukommt, etwa bei der Nitratreduktion (Mothes).

Seit den 1921 einsetzenden Untersuchungen von F. G. Hopkins wissen wir, dass das alte Philothion von de Rey-Pailhade mit dem Glutathion identisch ist. Nicht das Cystein (Bolomey, Maloeuf), sondern das Glutathion ist der die positive Nitroprussid-Reaktion verursachende niedrigmolekulare Bestandteil der meisten lebenden Zellen.

Dieses Tripeptid aus Cystein, Glutaminsäure und Glykokoll konnte aus Weizenkeimlingen, der Hefe, der Frucht der *Carica papaya* und anderem Material isoliert werden. Es erwies sich als ein Stoff, der die Aktivität zahlreicher Enzyme zu beeinflussen vermag. Aus diesem Grunde hat das Glutathion auch mit dazu beigetragen, viele Erfolge bezüglich der materiellen Zusammensetzung der aktiven und aktivierenden Gruppen in den Enzymen, deren Empfindlichkeit und komplizierter Bau die Anwendung der üblichen Methoden der organischen Chemie verbot, zu erzielen. Ob die HS-(Thiol-, Mer-

capto-, Sulphydryl-)Gruppe des Glutathions allerdings am Atmungsstoffwechsel direkt teilnimmt, wie die älteren Untersucher annahmen, ist sehr unwahrscheinlich. Wichtig für die Pflanzenphysiologie ist die Tatsache, dass das HS-Glutathion die Dehydroascorbinsäure zu Ascorbinsäure zu reduzieren vermag, denn das Vitamin C ist ein wesentlicher Hilfskatalysator vieler pflanzlicher Gewebe.

Die Bedeutung des Glutathions für die Funktion pflanzlicher Enzyme geht aus folgender Zusammenstellung hervor:

(1) Aktivierung der spaltenden Wirkung von Hydrolasen (Papain, Ficin, Bromelin, Urease, Ricinuslipase, saure Phosphatase, Cholinesterase) infolge Freilegung aktivierender Thiolgruppen im Enzymmolekül.

(2) Aktivierung infolge geeigneter Umwandlung des Substrates (Bildung eines Mercaptals aus Methylglyoxal und HS-Glutathion als Substrat der Methylglyoxalase).

(3) Aktivierung infolge Beteiligung als Zwischenkatalysator am Elektronentransport bei der phytochemischen Schwefel- und Nitratreduktion.

(4) Enthemmung enzymatischer Reaktionen durch Beseitigung hemmender Schwermetallionen mittels Komplexbildung (Reaktivierung der durch Kupferionen vergifteten Alkoholdehydrase, der durch Quecksilberionen vergifteten Urease usw.).

(5) Inaktivierung durch Abspaltung von Schwermetall aus der Wirkungsgruppe von Enzymmolekülen (komplexe Bindung des Zinkions der Zymohexase).

(6) Schutzwirkung infolge bevorzugter Reaktion mit Enzymgiften (Schutz der β -h-Fructosidase, der α -Glucosidase, der α - und β -Amylase vor der oxydativen Hemmung durch Dehydroascorbinsäure).

(7) Inaktivierung infolge Aufspaltung essentieller Disulfidgruppen im Enzymmolekül (Dipeptidase, Trypsin, Chymotrypsin).

Das Glutathion kommt in einer reduzierten (GSH) und in einer oxydierten Form (GSSG) vor. Beide bilden zusammen das Redoxsystem Glutathion.

HS-Glutathion,



F. 189–193°, [α]_{D²⁰} = –21.0° in Wasser. Bildet orthorombische Prismen. Ist leicht löslich in Wasser, unlöslich in absolutem Alkohol, löslich in wasserhaltigem Alkohol, Aceton oder Pyridin. Die far-

blöse wässrige Lösung reagiert sauer und zeigt einen schwachen charakteristischen Geruch.

Die Darstellung erfolgt aus Hefe (Schering A.G.) oder Weizenkeimlingen (Sullivan und Howe). Hingewiesen sei auf die von Harington und Mead, sowie du Vigneaud und Miller durchgeführte Synthese, durch die endgültig die auf analytischem Wege von Grassmann ermittelte Konstitution bewiesen wurde.

SS-Glutathion $C_{20}H_{32}O_{12}N_6S_2$, $[\alpha]_{5461}^{15} = -108^\circ$. Das Disulfidglutathion oder oxydierte Glutathion entsteht aus dem HS-Glutathion durch Einwirkung verschiedener Redoxsysteme positiveren Potentials. Das Redoxpotential des Glutathions beträgt $E'_0 = +0.068$ Volt. Persulfate, Persäuren, Hydroperoxyd, Jod, Eisen-(3) salze und Sauerstoff in Gegenwart von Eisensalzen sind die gebräuchlichsten Oxydationsmittel. Von Schöberl, Hornung, und Schaper stammt ein brauchbares Darstellungsverfahren der ziemlich labilen Verbindung.

Das Glutathion ist in Pflanzenteilen oft nachgewiesen worden. In Hefe ist der Gehalt verhältnismässig hoch: 221 mg% in frischer Bäckerhefe, 490–516 mg% in bei 100° getrockneter Bierhefe und 600–1000 mg% in getrockneter Hefe in Abhängigkeit von der Rasse u. den Züchtungsbedingungen. Nachgewiesen wurde das Glutathion in *Bacillus alcaligenes*, *B. proteus*, *B. pyocyaneus*, *B. prodigiosus*, *B. fluorescens*. Seine Gegenwart ist wahrscheinlich bei niederen (*Pythrinum*) und höheren Pilzen (*Saccharomycoides*, *Vadsonia*), Algen (*Fucus*) und bei Schachtelhalmen (*Equisetum*).

In höheren Pflanzen ist das Glutathion von Kozłowski nachgewiesen worden. Die frische Erbse (*Pisum sativum*) enthält wechselnde Mengen, in der trocken ist es nicht nachweisbar; wohl aber bildet es sich sofort nach der Keimung. In verschiedenen Partien von *Pelargonium*, der Stangenbohne, Mohn, Ahorn, Löwenmaul, Sonnenblume, Spargel, Radieschen, Lattich, Puffbohne, *Punica*, *Polygonatum*, *Stellaria*, *Iris*, *Elodea*, *Geranium*, *Viola*, *Primula*, *Cheiranthus*, *Lilium* u. a. ist seine Anwesenheit sehr wahrscheinlich. Beim Reifen grüner Tomaten in Äthylenatmosphäre beobachtet man ein Absinken des Glutathiongehaltes. Interessant ist die Beobachtung, dass der Glutathiongehalt der Kartoffelknolle beim Lagern nicht wesentlich abnimmt, im Gegensatz zum Gehalt an Ascorbinsäure. Durch Behandlung mit Äthylenchlorhydrin wird sogar eine Synthese auf Kosten des Sulfatschwefels induziert (Guthrie). Es scheint jedoch

sehr auf die Art der Lagerung anzukommen, denn Pett fand bei 5, 10, oder 15° zunächst einen ziemlich raschen Verlust, worauf nach 20–30 Tagen die Abnahme wesentlich langsamer wird. Beim Keimen wurde eine anfängliche Zunahme, sodann eine erhebliche Abnahme beobachtet.

Der Pressaft gesunder Kartoffeln enthält 2–5 mg% reduziertes Glutathion (Pfankuch).

Von Fiedler wurde beobachtet, dass HS-Glutathion in Konzentrationen unter 0.1 g. pro Liter stimulierend auf das Wurzelwachstum von Mais wirkt und vor allem die Bildung von Seitenwurzeln fördert.

Schliesslich sei noch auf die chemischen Eigenschaften des Glutathions etwas eingegangen. Das HS-Glutathion reagiert selbst in reinstem Zustand zum Unterschied vom Cystein mit Sauerstoff unter Bildung von SS-Glutathion und Hydroperoxyd. Die Geschwindigkeit der Autoxydation in wässriger Lösung ist stark temperatur- und pH-abhängig: beiderseits des Optimums bei pH 7.4 fällt sie ab, um bei pH 4.0 auf der sauren Seite auf Null zu sinken; in alkalischer Lösung findet eine langsame Zersetzung statt. Katalysatoren (Cu-, Fe-, Se-, Te-, Co-Verbindungen) beschleunigen oder verlangsamen (Ag-, Zn-, Cd-, Bi-, Ti-Verbindungen) in neutraler oder alkalischer Lösung sowohl die Autoxydation, als auch die Oxydoreduktion mit anderen Redoxsystemen, wie Methylenblau und Indigocarmin (pH 7.4). Auch Metalle in massiver oder fein verteilter Form können die Autoxydation von Glutathionlösungen beschleunigen; infolge der Bildung von Hydroperoxyd bei der Sauerstoffoxydation des HS-Glutathions findet ein Angriff der Metalloberfläche unter Ionenbildung statt und diese Ionen sind die Ursache mannigfaltiger "oligodynamischer" Wirkungen (Bersin). Cyanid verhindert die aktivierende Wirkung von Kupfer- und Eisensalzen, Pyrophosphat nur diejenige der Eisensalze auf die Autoxydation des HS-Glutathions. Bei vielen Autoxydationsversuchen ist nicht genügend auf die Möglichkeit eines hydrolytischen Zerfalls des Glutathions und damit die Bildung mit anderer Geschwindigkeit reagierender Stoffe geachtet worden. Es ist nämlich bekannt, dass HS-Glutathion schon bei 37° in wässriger Lösung, noch schneller beim Kochen, unter Bildung von Glutaminsäure und Cysteinylglykokoll hydrolysiert wird; die erstere Verbindung kann sich leicht zu Pyrrolidincarbonsäure cyclisieren und aus der zweiten entsteht über das entsprechende Diketopiperazin unter Schwefelwasserstoff-Entwicklung eine Reihe noch nicht

identifizierter Zersetzungsprodukte. Die Eisenverbindung des Glutathions addiert im Gegensatz zur Eisen-(2)-verbindung des Cysteins kein Kohlenoxyd, wohl aber die Nickelverbindung; die Letztere ist aber nicht durch Licht spaltbar, während Eisen-(2)-Kohlenoxyd-Cysteinat von Licht zerlegt wird. Von Warburg ist allerdings eine Kohlenoxydverbindung des Eisen-(2)-glutathions beschrieben worden.

Carboxypeptidase spaltet aus dem Glutathion Glykokoll ab. Aus der sauren wässrigen Lösung wird Glutathion von Aluminiumhydroxyd sowie Tierkohle leicht adsorbiert, wobei in letzterem Falle teilweise Oxydation eintritt. Durch β - und γ -Strahlen des Radiums, Röntgenstrahlen, noch intensiver jedoch durch ultraviolettes Licht wird HS-Glutathion hydrolytisch und oxydativ zersetzt.

Das wenig lösliche Kupfer-(1)-salz oder auch das Calciumsalz werden zur Reinigung des Glutathions verwandt.

Mit Dehydroascorbinsäure bildet HS-Glutathion einen Komplex 1:1 (Drake, Smythe, und King). Nach Lemoigne, Monguillon, und Désveaux wird salpetrige Säure von GSH zu Hydroxylamin und Ammoniak reduziert. Dem Vorgang kommt offenbar grosse biologische Bedeutung bei der Stickstoffassimilation zu.

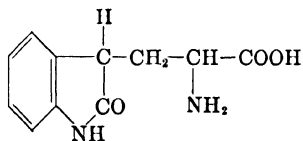
Phalloidin. Im giftigen Knollenblätterschwamm (*Amanita phalloides*) entdeckten Wieland und Witkop ein schwefelhaltiges Hexapeptid $C_{30}H_{39}O_9N_7S$, $[\alpha]_D = +63.3^\circ$ (in Alkohol). 220 kg. Pilze lieferten 5.9 g. reines Phalloidin, wie das Peptid benannt wurde. Als Hydrolysenprodukte liessen sich 4 Aminosäuren isolieren: L-Cystin, L-Alanin, L-Oxytryptophan, und L-Oxyprolin b.



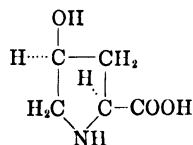
L-Cystein



L-Alanin



L-Oxytryptophan



L-Oxyprolin b

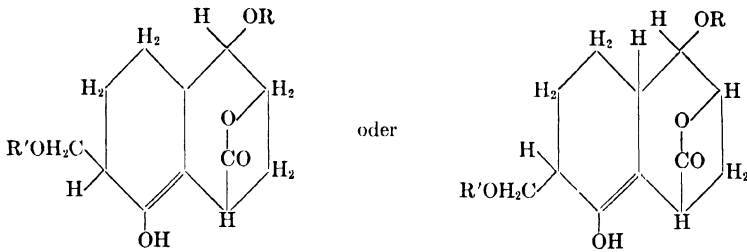
Die Entdecker nehmen an, dass der Giftstoff Phalloidin aus 1 Mol l-Oxytryptophan + 1 Mol Cystein + 2 Mol l-Oxyprolin b + 2 Mol Alanin—6 H₂O besteht. Die Giftwirkung ist augenscheinlich im eigenartig gebauten Peptidsystem zu suchen. Auf Grund der Ueberlegungen von Meusel und Orzechowski, wonach die Vergiftungs-

erscheinungen nach Phalloidin auf Adsorption und Umladung der Zellmembranen zurückzuführen sind, kann angenommen werden, dass dieses Peptid auch bei dem erzeugenden Pilz eine für den Stoffaustausch günstige Permeabilitätswirkung besitzt. Ganz allgemein wäre daher die Arbeitshypothese diskutierbar, wonach Alkaloide und ähnliche pflanzliche Giftstoffe, wie Ricin, Abrin, Crotin, Robin u. a., keineswegs Abfallprodukte des pflanzlichen Stoffwechsels sind, sondern spezifische Grenzflächenveränderungen bewirken, welche einen besonderen Selektionswert besitzen.

Amanitin. Das Hauptgift des Knollenblätterpilzes, das Amanitin, $C_{39}H_{45}O_{12}N_7S$, F. 245° (Zers.), konnte seiner Zusammensetzung nach bisher nicht völlig geklärt werden (Wieland und Lynen); es enthält jedenfalls ein Indolderivat. Die Giftwirkung beider Peptide ist als fermentative Störung gedeutet worden (Krause); die Verdrängung des Trägerproteins eines wichtigen Zellenzyms von der Wirkgruppe durch derartige Peptide liegt im Bereich des Möglichen.

Viscotoxin. Unter den Inhaltsstoffen der Mistel, *Viscum album*, fand nach Vorversuchen von Jarisch, der auf der Suche nach einem gewebnekrotisierenden Bestandteil war, Winterfeld mit Bijl ein schwefelhaltiges Peptid, dem der Name Viscotoxin gegeben wurde. Aus 1 kg. Mistelpulver wurden durchschnittlich 0.5–1 g. einer Verbindung $C_{34}H_{68}O_{18}N_{10}S$, Reineckat Zers.P. $263\text{--}266^\circ$, Pikrat Zers.P $198\text{--}200^\circ$ gewonnen. Der isolierte Wirkstoff ist von weisslicher Farbe und pulveriger Beschaffenheit. Er ist in Wasser und Methanol spielend leicht löslich. Die hellbraun-gelb gefärbte wässrige Lösung besitzt schwach saure Reaktion und schäumt stark. Die dosis letalis bei der Ratte liegt bei 1.2 mg./kg. Die kolloiden Eigenschaften der wässrigen Lösung, die Aussalzbarkeit durch Ammonsulfat und die positive Biuret-, Xanthoprotein-, Millon-, und Schwefelbleireaktion sprechen für das Vorliegen eines Peptids. Die Säurespaltung lieferte eine Zunahme von formoltitrierbarem Stickstoff. Bei der Selendehydrierung treten Pyridinabkömmlinge auf; die Fichtenspanreaktion ist positiv. Ein Bestandteil des Moleküls muss phenolischen Charakter haben. Wegen seiner bemerkenswerten Eigenschaft, Geschwülste zum Zerfall zu bringen, wäre eine baldige Aufklärung der Struktur des Viscotoxins sehr erwünscht.

Winterfeld und Rink haben (1949) auf Grund der Untersuchung eines saueren Hydrolysats des Viscotoxins dieser Verbindung folgende Konstitution zugesprochen:



R = Peptidkette aus 1 Cystein-, 1 Serin- und 2 Argininresten

R' = Glucuronylest

B. Schwefelhaltige Proteine

Nicht enzymatisch wirksame Phytoproteine. *Virusproteine.*

Die erstmalige Isolierung des Tabakmosaikvirus in kristallisierter Form durch Stanley gestattete es, die Virusaktivität mit chemischen und physikalischen Daten in Korrelation zu bringen. Bekanntlich stellte es sich heraus, dass es sich um ein Nucleoprotein handelt. TMV enthält 16% Stickstoff, etwa 48% Kohlenstoff, 7,3% Wasserstoff, etwa 0,6% Phosphor und etwa 0,2% Schwefel.

Es war frühzeitig aufgefallen, dass alle pflanzenschädigenden Virusproteine durch Schwermetallionen, welche Mercaptide bilden, inaktiviert werden. So wird die Infektiosität des TMV durch HgCl_2 , CuSO_4 und AgNO_3 je nach *pH*, Konzentration, und Behandlungsdauer mit verschiedener Geschwindigkeit vernichtet. Diese Tatsachen und der Gehalt an Schwefel liessen vermuten, dass das hochmolekulare Nucleoprotein an der Aktivität beteiligte Thiolgruppen von eingebauten Cysteinmolekülen enthält (Doerr-Hallauer). In der Tat konnten Ross und Stanley zeigen, dass der S-Gehalt sich zu 0,04% auf Methionin, zu 0,0–0,04% auf Sulfat und zu 0,14% auf Cystin + Cysteinschwefel verteilt. Im aktiven Virus sind allerdings keine Thiolgruppen nachweisbar, wohl aber treten solche bei der Denaturierung in Erscheinung. Da ausserdem die Aktivität des Virus durch milde Oxydationsmittel, wie etwa das bei der kupferkatalysierten Autoxydation von Ascorbinsäure auftretende Hydroperoxyd, zerstört wird, was auf Bildung eines inaktiven Disulfidvirus schliessen lässt, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Virusaktivität von dem Vorliegen freier doch maskierter Thiolgruppen ähnlich abhängt, wie die enzymatische Aktivität des Papains an die unversehrten HS-

Gruppen gebunden ist (s.u.). Werden die Thiolgruppen des Virusmoleküls durch Jod zu Disulfidgruppen oxydiert, so resultiert ein reversibel inaktiviertes Produkt; die damit infizierten Pflanzen antworten mit der Produktion eines aktiven HS-Proteins, da im Zellsaft eine Reduktion zum ursprünglichen Thiolvirus stattfindet (Anson und Stanley). Allerdings muss man bei der Deutung der Inaktivierung durch Jod vorsichtig sein. So hat Anson 1940 gezeigt, dass Jod bei pH 6.8 sowohl mit Cystein, als auch mit Tyrosin reagieren kann. Bei pH 3.2 reagieren mit verdünnter Jodlösung lediglich Cystein und Tryptophan.

Die zur Selbstreproduktion befähigten Virusmoleküle von der Art des Tabakmosaikvirus stellen auf Grund dieser Ergebnisse Eiweissmoleküle mit aktivierenden Thiolgruppen dar. Es ist denkbar, dass sich auf Grund dieser Tatsache eines Tages Mittel zur Bekämpfung dieser unerwünschten Schädlinge unserer Kulturpflanzen finden werden.

Bei der Kartoffel z.B. bedingen die als Viruskrankheiten erkannten Abbauerscheinungen (Schick) starke Unsicherheiten oder Schwankungen des Ernteertrages. Von Pfankuch und Lindau ist auf die Negativierung des Redoxpotentials in den abbaukranken Kartoffelknollen hingewiesen worden. Die Ursache der höheren Reduktionskraft kranker Knollen konnte nicht auf einer Erhöhung der Konzentration des HS-Glutathions beruhen, denn der bei 2–5 mg% liegende Gehalt der Pressäfte zeigte eine nur geringfügige durchschnittliche Zunahme gegenüber den Vitalknollen. Ähnliches gilt für den bei etwa 20 mg% liegenden Ascorbinsäuregehalt der Pressäfte. Wohl aber fand sich eine Erhöhung der Monosen-Konzentration und eine erhöhte Atmung bzw. CO₂-Produktion. Es wurde auf eine beschleunigte oxydoreduktive Umsetzung der aus den Monosen entstehenden Triosephosphatester infolge Aktivitätssteigerung der beteiligten Redoxasen geschlossen. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch die hohe Phosphataseaktivität der virusinfizierten Knollen.

Die Virusproteine greifen demnach in den enzymatischen Stoffwechsel ein. Ob es sich allerdings um eine direkte Wirkung auf die Enzyme handelt oder ob infolge mangelnder Aminosäuren, welche zur Virussyntese verbraucht werden, die Bildung bestimmter Enzyme bevorzugt, anderer wieder benachteiligt wird, lässt sich noch nicht entscheiden. Der gesteigerte Verbrauch der schwefelhaltigen Amino-

säuren in der infizierten Pflanze für die Vernetzung der Polypeptidketten im Virusmolekül muss jedenfalls schwere Störungen für den Aufbau der katalytisch und nicht katalytisch wirkenden Proteine der Zellen nach sich ziehen.

Klebereweiss. Schon Czapek weist darauf hin, dass der Hauptbestandteil des Klebers der Gramineensamen alkohollösliche sogen. Prolamine darstellen, neben denen alkoholunlösliche Fraktionen vorkommen. Beide Kleberbestandteile sind zur Teigbildung notwendig. Das alkohollösliche Gliadin des Weizenklebers ist durch seinen hohen Gehalt an Glutaminsäure und Prolin bemerkenswert.

Entscheidend für die Backfähigkeit von Weizenmehl ist die kolloide Eigenschaft der Kleberproteine. Diese müssen eine gewisse optimale Viskosität und Dehnbarkeit besitzen, um im Brot das durch Gärung oder Zersetzung von Carbonaten gebildete Kohlendioxyd in entsprechenden Poren zurückzuhalten. Die Untersuchung des Weizenklebers (Ritter) hat gezeigt, dass in diesem natürlichen Hochpolymeren die Vernetzung der Fadenmoleküle zu Rosten auch durch Disulfidbrücken herbeigeführt wird. Spaltet man reduktiv oder hydrolytisch die —S.S—Brücken auf, so bilden sich HS-Gruppen, wodurch infolge Aufhebung der Vernetzung der Kleber seine charakteristischen durch die Vernetzung bedingten Eigenschaften, z.B. der Schwerlöslichkeit, der begrenzten Quellbarkeit usw., verliert. Dadurch erklärt sich der Verlust der elastischen Eigenschaften des Klebers bei der Behandlung mit Schwefelwasserstoff, Sulfit, HS-Glutathion, Thioglykolsäure, Thiomilchsäure, und Kaliumcyanid. Feuchtkleber zeigt erst nach Behandlung mit diesen "Rostspaltern" eine positive Reaktion auf Thiole mittels Nitroprussidnatrium. Das Glutathion verdankt seine kleberschwächende und teigerweichende Wirkung nicht nur der Aktivierung der Weizen- und Hefeproteinase, sondern auch der direkten Wirkung auf das Kleberprotein im Sinne einer Umsetzung nach: $2\text{GSH} + \text{RSSR} \rightleftharpoons \text{GSSG} + 2\text{RSH}$. 1 Teil Disulfidglutathion auf 25,000 Teile Mehl wirkt dagegen infolge der Vernetzung nach der von rechts nach links verlaufenden Reaktion wieder backverbessernd (Ziegler).

Eine Verbesserung der Backfähigkeit wird durch Zusatz von Kaliumbromat oder ähnlichen milden Oxydationsmitteln zum Mehl erreicht; diese Stoffe verwandeln, wie zuerst Jörgensen gezeigt hat, den Thiolkleber mancher Weizensorten in Disulfidkleber und schalten störende niedrigmolekulare Thiole aus. Eigenartig ist die Wirkung

des starken Oxydationsmittels Stickstofftrichlorid NCl_3 , das beim sogen. Agone-Verfahren auf den Weizenkleber zur Einwirkung kommt. Zugleich mit einer Bleichwirkung wurde das Auftreten, allerdings einer nur bei Hunden sich manifestierenden, toxischen Wirkung (Hundeepilepsie) beobachtet. Es ist möglich, dass die durch Oxydation aus den Disulfidbrücken gebildeten Cysteinsäureester den entstandenen Polypeptiden eine solche Eigenschaft verleihen, dass die Enzyme der Bakterienflora des Hundedarmes daraus toxische Produkte bilden.

Enzymatisch wirkende Phytoproteine. Die Eiweisskomponente zahlreicher Enzyme enthält offene oder maskierte Thiolgruppen, die zum Teil leicht reaktionsfähig sind. Von ihrer Gegenwart oder Abwesenheit hängt die Aktivität dieser Enzyme entscheidend ab. Die leicht reagierenden HS-Gruppen können durch milde Oxydations- und Alkylierungsmittel sowie durch mercaptidbildende Agenzien ausgeschaltet werden. Alle Enzyme enthalten ausserdem Disulfidgruppen. Wegen ihrer charakteristischen Eigenschaften fasst man die genannte Gruppe zusammen und bezeichnet sie als Thiolenzyme.

Zu den Thiolenzymen pflanzlichen Ursprungs zählt man heute folgende:

Papain, Bromelin, Ficin und die verwandten Phytoproteasen	Carboxylase
Urease	Transaminase
Arginase	D-Aminosäureoxydase
„Saure“ Phosphatase	Brenztraubensäureoxydase
Adenosintriphosphatase	Succinodehydrase
Zymohexase	Cholinoxydase
	Alkoholdehydrase

Vermutlich gehören noch verschiedene andere Fermente zu dieser Gruppe. Die Thiolenzyme vermitteln den Stoffwechsel der verschiedenartigsten Verbindungen in der Pflanze. Eine Hemmung dieser organischen Katalysatoren bedeutet daher eine tiefgehende Störung des Gesamtorganismus bzw. bestimmter Gewebe oder Zellen. Enthemmungsmittel können andererseits regulierend in enzymatische Stoffwechselprozesse eingreifen. Die durch Oxydationsmittel oder mercaptidbildende Agenzien herforgerufene Enzymhemmung kann nämlich durch Thiolverbindungen wieder beseitigt werden (Bersin). Ausser den natürlich vorkommenden Thiolen, wie HS-Glutathion, Cystein, Cysteinpeptide, Homocystein erweisen sich hierbei als besonders wirksam die synthetischen Dithiole (Barron und Mitarbei-

ter) von der Art des Dimercaptopropanols $\text{HSCH}_2 \cdot \text{CHSH} \cdot \text{CH}_2\text{OH}$, da sie stabile ringförmige Metallkomplexe mit den vergiftenden Ionen bilden.

Bei der Prüfung der individuellen Enzyme auf aktivierende Thiolgruppen mittels solcher Inhibitoren wie Jodessigester oder Bromacetophenon ist die Gegenwart protektiver Substanzen in unreinen Präparaten der Enzyme zu berücksichtigen. So enthalten vielfach aktive, aber nicht kristallisierte Enzympräparate wechselnde Mengen von denaturiertem Enzym, welches wegen der bei der Denaturierung freiwerdenden Thiolgruppen Schutzwirkungen entfaltet. Vergleichende Messungen müssen daher möglichst zu gleicher Zeit mit dem gleichen Präparat durchgeführt werden (Mackworth).

Papain. Im gesamten niederen und höheren Pflanzenreich findet sich ein zur Klasse der Proteinasen gehörendes Enzym, das in neutralem oder schwach sauren Gebiet—optimal bei $\text{pH } 5$ (Hoover und Kokes)—Proteine und gewisse Peptide hydrolytisch spaltet, vorausgesetzt, dass das Redoxpotential genügend¹ negativ ist; bei Verschiebung ins positive Gebiet offenbart das Ferment synthetische Leistungen. Das im Saft der *Carica papaya* besonders reichlich vorkommende Enzym erhielt den Namen Papain. Es ist hier nicht der Ort zu einer eingehenden Beschreibung seiner Eigenschaften; nur soweit ein Zusammenhang mit dem Schwefelstoffwechsel besteht, soll auf gewisse charakteristische Eigenschaften eingegangen werden.

Dem Papain sehr ähnliche Enzyme finden sich weiter im Saft des Feigenbaumes *Ficus carica*, in der Hefe, in den Früchten von *Cucumis utilissimus*, in *Calotropis procera*, im Mohnsaft, in *Cocos nucifera*, in Ananas (Bromelin), Bananen, Weintrauben, im Weizenkorn, im Hafermehl und in Hefe, sowie im Sekret der insektenfressenden Pflanzen, z.B. *Nepenthes*.

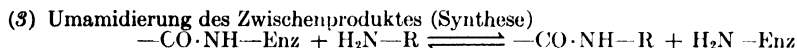
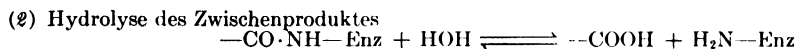
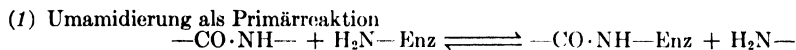
Das Papain aus der *Carica papaya* ist selbst ein Protein und lässt sich in kristallisiertem Zustand isolieren. Von Kassell und Brand ist die Schwefelverteilung im Papain untersucht worden; danach sind darin enthalten:

Total-S, nach Pregl, %.....	3.01	<i>Es beträgt der Gehalt an:</i>	
Total-Protein-S, %.....	1.47	Cystin, %.....	3.2
Davon: Cystin, %.....	58	Cystein, %.....	1.0
Cystein, %.....	18	Methionin, %.....	0.46
Methionin, %.....	7		
Unbestimmt, %.....	17		
Sulfat-S, %.....	1.54		

Diese Befunde sind von anderer Seite bestätigt worden. Balls und Lineweaver wiesen im aktiven krystallisierten Papain Thiolgruppen nach, womit endgültig die von Bersin auf Grund von Hemmungs- und Aktivierungsversuchen vorgenommene Deutung des Zusammenhanges zwischen Aktivität und Art der Schwefelbindung im Enzym bewiesen erscheint.

Das von Fruton und Lavin aufgenommene Absorptionsspektrum des Papains lässt eigenartigerweise die Tyrosinbande vermissen. Vermutlich enthält das Papainmolekül reichlich Diaminomonocarbonsäuren, denn nach Ringer wandert es bei pH 2.5–8 kathodisch.

Die wirksame Gruppe des Enzymmoleküls, welches sich nicht ohne Zerstörung in Wirkgruppe und Träger zerlegen lässt, ist wahrscheinlich eine aktivierte Aminogruppe. Deren Reaktionsfähigkeit ist durch Dipolinduktion seitens einer benachbarten Thiolgruppe so gesteigert, dass Umamidierungen, Hydrolysen, und Synthesen (M. Bergmann und Mitarbeiter) mit grosser Geschwindigkeit verlaufen:



Das Eintreten einer Umamidierung nach (3) ist abhängig von der Löslichkeit des entstehenden Säureamids; ist dieses schwer löslich und scheidet somit aus dem Gleichgewicht aus, so erfolgt Umamidierung. Eine Stütze für die Hypothese von der aktivierenden Wirkung der Thiolgruppe im Papainmolekül kann in der von Greenstein experimentell ermittelten Tatsache gesehen werden, wonach HS-Gruppen gewisse benachbarte $\text{CO}\cdot\text{NH}$ -Bindungen leichter hydrolysierbar machen. So geht z.B. Anhydrocysteinylcystein schon bei der Einwirkung kalter Säuren in das Dipeptid Cysteinylcystein über, während Anhydroalanylalanin zu diesem Zwecke lange mit konzentrierter Säure gekocht werden muss.

Die reaktionsfreudige Thiolgruppe des aktiven Papains ist die Ursache der Redox Eigenschaften dieser Hydrolase. Durch Dehydrierung kann ein reversibel inaktiviertes Disulfidenzym erhalten werden, dessen Aktivierung durch Negativierung des Redoxpotentials mittels spezifischer Reduktionsmittel gelingt. Das Optimum des

Redoxpotentials wurde bei pH 5.5 bei etwa 360 mV ermittelt (Reiss); es hat naturgemäss für andere Säurestufen andere Werte. Bei einer Positivierung des Redoxpotentials von etwa 400 mV ab durch Zusatz von Jodat oder Hydroperoxyd können die synthetisierenden Eigenschaften des Papains—erkennbar an der Abnahme des formoltitrierbaren Stickstoffes—auffällig hervortreten. Mit anderen Worten: das Disulfidpapain zeigt bevorzugte synthetische Fähigkeiten. Es wird damit verständlich, weshalb der Proteinabbau und die Proteinsynthese in der Pflanze eine Abhängigkeit vom Redoxpotential zeigt. Allerdings darf nicht verschwiegen werden, dass eine Proteinsynthese nicht nur die Verknüpfung von Aminosäuren zu Polypeptidketten sondern auch noch die Vernetzung der Polypeptidketten zum Proteinmolekül voraussetzt. In welcher Weise die letztere Reaktion gelenkt wird, ist noch nicht bekannt. Wohl hat man Proteinsynthesen in vitro durchführen können (Voegtlin u. a.), doch erfordert die Bildung von, beispielsweise serologisch einheitlichen, Proteinen zweifellos bestimmte Richtkräfte oder Matritzen, worüber vorläufig noch kaum etwas bekannt ist.

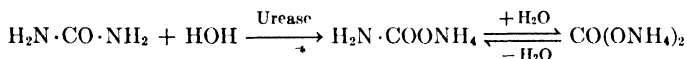
Im Zusammenhang mit Fragen der Virusinfektion von Pflanzen hat die Gegenwart von Papainasen, wie man die dem Papain ähnlichen Pflanzenproteinasen genannt hat, in Blättern Interesse erregt. Es ist denkbar, dass die Aktivität dieser Proteasen einen Einfluss auf das Angehen oder Nichtangehen der Virusinfektion hat. Von Tracey stammt eine Zusammenstellung der Aktivität der bei optimal pH 5 wirkenden Proteinase in Saft von Blättern verschiedener Pflanzen:

Pflanzen	Einheiten/ Gramm Protein-N	Pflanzen	Einheiten/ Gramm Protein-N
<i>Nicotiana tabacum</i>	25-1,040	<i>Brassica oleracea</i>	263
<i>Solanum tuberosum</i>	150-780	<i>Phaseolus vulgaris</i>	375
<i>Solanum dulcamara</i>	1,020	<i>Triticum vulgare</i>	350-580
<i>Lycopersicum esculentum</i>	370	<i>Dactylis glomerata</i>	202
<i>Beta vulgaris</i>	60-400	<i>Ananas sativus</i>	13,000
<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>ovifera</i>	244	(Papain, 0.005 mg. N/ml.)	84,000
<i>Bryonia dioica</i>	130		

Urease. Die Ammoniakbildung aus Harnstoff in faulendem Harn ist auf ein sehr spezifisches Enzym des *Micrococcus ureae* zurückzuführen. Dieses Enzym, die Urease, wurde weiter in Bakterien,

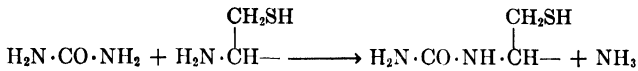
Pilzen, Pflanzensamen, und Leguminosen gefunden. Die Harnstoffzersetzer des Ackerbodens sind der sporenbildende *Bacillus probatus* und *Sarcina ureae*. Nach Winogradsky und Winogradsky ist Urease auch in den Wurzelknöllchen der Leguminosen nachweisbar. Sehr wichtig erscheint der Befund von Conrad, wonach an Lignoproteinverbindungen des Bodens gebundene Urease, vermutlich aus abgestorbenen Bakterienleibern, die Ammoniakbildung aus Harnstoff durchzuführen vermag.

Urease beschleunigt die Hydratisierung von Harnstoff zu carbaminsaurem Ammonium bei pH 7 (vgl. v. Euler), das im Gleichgewicht mit Ammoniumcarbonat steht:



Nachdem Sumner im Jahre 1926 die Darstellung des reinen kristallisierten Ferments aus dem Mehl der Jackbohne, *Canavalia ensiformis*, gelungen war, wissen wir, dass es sich um ein Thiolenzym handelt. Sumner und Poland zeigten, dass die reine kristallisierte Urease eine positive Nitroprussidreaktion zeigt. Unter der Annahme von einer Thiolgruppe je Molekül berechnet sich für das Ferment ein Äquivalentgewicht von rund 15,000. Die Teilchengröße des Ureasemoleküls liegt nach Messungen mit der Ultrazentrifuge in der Nähe von 473,000. Es hat den Anschein, als ob jedes 6. Atom Schwefel als HS-Gruppe vorliegt, während die anderen möglicherweise als Disulfid, vielleicht auch als Thioäther (Methionin) gebunden sind. Von Hellerman und Mitarbeitern, sowie Bersin und Köster wurde nachgewiesen, dass Vergiftungs- und Aktivierungserscheinungen an der Urease nur so erklärt werden können, dass die Thiolgruppe des Enzyms als aktivierende Gruppe selbst verändert wird. Oxydationsmittel hemmen oder zerstören, Reduktionsmittel reaktivieren. Ein Teil der HS-Gruppen kann allerdings durch Thiolreagentien, wie Jodacetamid oder Porphyrindin, blockiert werden, ohne dass Inaktivierung eintritt; demnach sind nicht sämtliche Thiolgruppen als aktivierend zu bezeichnen.

Die katalytische Eigenschaft des Proteins Urease ist auf die durch Thiolgruppen ausserordentlich gesteigerte Reaktionsfähigkeit einer funktionellen Gruppe des Moleküls zurückzuführen und zwar wahrscheinlich einer Aminogruppe. Diese reagiert mit dem Harnstoff unter Bildung einer Uraminosäure und Ammoniak:



Die Uraminosäure wird anschliessend zur Carbaminsäure unter Rückbildung des Enzyms hydrolysiert:



Die von verschiedenen Autoren beobachtete Vergiftung der Urease durch Ionen des Hg, Cu, Ni, Ag, Zn, Cd, U, Au, Pt, Co, Ce, Mn, Fe, durch Jod, Sauerstoff, Selenit, *p*-Chlorquecksilberbenzoat, *o*-Jodosobenzoat, Hydroperoxyd, und Chinone, sowie Wolframat fügen sich dem Bilde eines Thiolenzym auf's beste ein. Die reduktive Aktivierung durch HS-Glutathion, Cystein, Thioglykolsäure, Schwefelwasserstoff, Thiolessigsäure, Hydrosulfit, Blausäure, und Arsenobenzol beweist die Disulfidnatur der reversibel oxydativ inaktivierten Urease.

Dass die Disulfidurease zu bevorzugten synthetischen Leistungen befähigt ist, konnte M. Tono zeigen: in Abhängigkeit vom Redoxpotential des Mediums wird entweder Harnstoff hydrolysiert oder aus Ammoniumcarbaminat Harnstoff synthetisiert. Es wurde ein Enzympräparat aus Jackbohnen bzw. Sojabohnen verwendet.

Bemerkenswert erscheint in diesem Zusammenhang der Befund von Iwanoff, wonach Hutpilze nur bei mangelnder Kohlenhydratzufuhr das aus dem Eiweissstoffwechsel stammende Ammoniak zu Harnstoff synthetisieren. Infolge eines Mangels an Reduktionsmitteln kommt es zur Ausbildung eines positiven Redoxpotentials im Gewebe des Pilzes, so dass die normalerweise mittels einer Redoxase aufrechterhaltene Konzentration an hydrolysierender Thiolurease absinkt und die Synthese durch die Disulfidurease zum Zuge kommt.

Nach älteren Angaben nimmt der Gehalt von Samen und Früchten sowohl beim Reifen, als auch beim Keimen zu. Die Urease ist in den innersten Samentteilen, nicht in der Schale lokalisiert. Von Granick ist die Verteilung der Urease in *Canavalia ensiformis* untersucht worden. Im Stadium der Zellteilung wurde im Parenchym eine starke Synthese des Ferments beobachtet, welche mit dem Aufhören der Zellstreckung ihr Maximum erreicht. Mit zunehmendem Alter findet dann eine Abnahme an Urease statt. Im Kambium und dem sich aus ihm ableitenden Xylem und Phloem konnte das Ferment

nicht nachgewiesen werden. Samen und besonders der Embryo sind sehr reich an Urease.

VII. AM SCHWEFELSTOFFWECHSEL BETEILIGTE ENZYME

Die verschiedenen in den Pflanzen vorgefundenen schwefelhaltigen Verbindungen verdanken ihre Entstehung, soweit sie nicht aus dem Erdboden oder der Luft aufgenommen worden waren, der Tätigkeit zahlreicher organischer Katalysatoren. Diese am Schwefelstoffwechsel beteiligten Enzyme sind nur zum geringsten Teil bekannt. Die bisher etwas genauer charakterisierten Fermente lassen sich in zwei Gruppen einordnen: die zu den Redoxasen zu zählenden Enzyme Cysteinase, Cystinase, Cystindesulfurase, Sulfurase, Desulfincase u. a., sowie die zu den Hydrolasen gehörenden Sulfatasen.

Während die letzteren lediglich die Hydrolyse und vielleicht die Synthese von Schwefelsäureestern bewirken, sind die ersteren für die viel wichtigeren oxydoreduktiven Umwandlungen der Schwefelverbindungen verantwortlich. Das ganze Gebiet befindet sich erst im Aufbau und gesicherte Tatsachen sind erst spärlich zu verzeichnen.

A. Schwefelspezifische Redoxasen

Als Redoxasen werden Enzyme bezeichnet, welche ein Oxydationsmittel und ein Reduktionsmittel, die spontan nicht reagieren, zum Umsatz bringen. Der elementare Schwefel kann beispielsweise nicht mit elementarem Wasserstoff reagieren, wohl aber existiert ein Enzym, welches beide Elemente unter Schwefelwasserstoffbildung zur Reaktion bringt. Es ist weiterhin bekannt, dass Thiolverbindungen, wie etwa das HS-Glutathion mit elementarem Schwefel unter H_2S -Bildung reagieren, wobei das entsprechende Disulfid gebildet wird; ist gleichzeitig ein Enzym vorhanden, welches Wasserstoff von einem Kohlenhydrat auf das Disulfid zu übertragen vermag, so kann bei Gegenwart dieses Kohlenhydrats eine indirekte Schwefelhydrierung bewerkstelligt werden. Derartige Verhältnisse liegen augenscheinlich bei verschiedenen Bakterien vor. Aber auch die höheren Pflanzen verfügen alle über Enzyme, welche Disulfide zu Thiolen reduzieren und zwar zumeist auf Kosten von Kohlenhydraten bzw. deren Stoffwechselprodukten, welche der Oxydation verfallen.

Die Schwefelwasserstoffbildung aus schwefelhaltigen Aminosäuren ist ein Vorgang, der noch der Klärung bedarf. Garnichts ist über

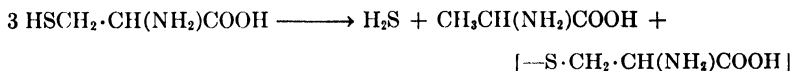
Enzyme bekannt geworden, welche die Synthese der schwefelhaltigen Aminosäuren bewirken.

Wie die Synthese von Thioäthern, Senfölen und Thioharnstoffen in der pflanzlichen Zelle erfolgt, ist ebenfalls nicht bekannt. Man muss mit der Möglichkeit rechnen, dass auch nichtenzymatische Anlagerungs- und Kondensationsreaktionen hierbei eine Rolle spielen, ähnlich wie das bei der Alkaloidsynthese der Fall ist.

Die Schwefelhydrierung. Wie Ahlström, von Euler und Gernow gezeigt haben, vermag ein thermolabiles Enzymsystem der Hefe, an dem möglicherweise Thiole beteiligt sind, elementaren Schwefel zu Schwefelwasserstoff zu hydrieren. Bemerkenswerterweise gibt es Bakterien, z.B. im Hundedünndarm (Andrews), welche wohl aus Schwefel, Thiosulfat, Sulfit, Methionin und L-Cystin, jedoch nicht aus Cystein oder Sulfat Schwefelwasserstoff zu bilden vermögen.

Cystinase. Von Desnuelle, Wookey, und Fromageot ist im *Propionobacterium pentosacrum* ein Enzym oder Enzymsystem gefunden worden, welches nicht Cystein, wohl aber L-Cystin in Gegenwart von Glucose oder Glycerin als Reduktionsmittel unter H₂S-Bildung abbaut; D-Cystin wird nicht angegriffen, wohl aber D,L-Cystin und Mesocystin.

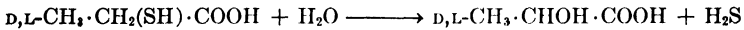
Cysteindesulfurase (l-Cysteinase). Das Ferment wurde von Binkley aus *Escherichia coli* angereichert. Fromageot und Mitarbeiter haben es in *Bac. subtilis* und *B. coli* nachgewiesen und glauben ihm auf Grund von Hemmungsversuchen Ketoncharakter zuschreiben zu müssen. Die Umsetzung verläuft bei 45° und pH 6.4–6.6 augenscheinlich nach (vgl. Smythe und Halliday):



Von Baumgärtel ist Schwefelwasserstoff-Bildung aus Cystin beim anaeroben Fäulniserreger *Bac. putrificus verrucosus*, der auch Cystin zu Cystein reduziert, beobachtet worden, was auf Vorliegen der Cysteindesulfurase bei dieser Bakterienpezies schliessen lässt.

Sulfurase. Während die Cysteindesulfurase aus *B. coli* einen Wasserstoffdonator benötigt und auch im Mazerationssaft wirksam bleibt, existiert im gleichen Mikroorganismus ein weiteres Enzym— von Fromageot, Moubasher, und Desnuelle Sulfurase genannt— welches ohne H-Donator Glutathion und Thiomilchsäure unter H₂S-

Bildung zerstetzen soll. Die Umsetzung bei der Thiomilchsäure soll wie folgt verlaufen:



Die Individualität dieses Enzyms erscheint fragwürdig.

Desulfuricase. Von Fromageot und Chatanger wurde in der Leber höherer Tiere ein Enzym entdeckt, das aus L-Cysteinsulfosäure Sulfit abspaltet. Ob diese Desulfuricase auch im Pflanzenreich vorkommt, ist nicht bekannt geworden, jedoch sehr wahrscheinlich.

Sonstige Redoxasen. Von Barber und Burrows wurde bei einem Bodenbakterium *Achromobacter cystinovorum* eine aerobe Zersetzung des Cystins unter Bildung von elementarem Schwefel, Ammoniak, und Kohlendioxyd beobachtet; Schwefelwasserstoff scheint nicht zu entstehen. Ganz augenscheinlich sind an diesen Umsetzungen mehrere Enzyme beteiligt, darunter die Cystinase.

Der durch langsame Umsetzung von Eisen mit Wasser gebildete molekulare Wasserstoff kann von sulfatreduzierenden Bakterien, welchen NaHCO_3 als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung stand, nicht nur zur Reduktion von Sulfat zu Sulfid (Starkey und Wight), sondern auch als Wachstumsquelle benutzt werden, wie Butlin und Adams gezeigt haben. Hier ist die noch wenig untersuchte Hydrogenase beteiligt, von der es bekannt ist, dass sie die Reduktion von Sulfat mittels molekularem Wasserstoff zu katalysieren vermag.

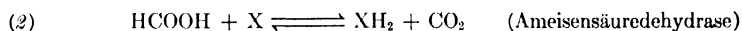
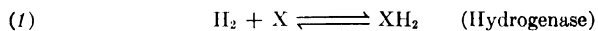
Auf welche Weise die enzymatische Reduktion von Sulfat zu organischen Disulfiden, z.B. in den Wurzelspitzen von Bohnen (Hammett und Reynolds), erfolgt, ist bis heute unklar, denn es konnte kein Enzym isoliert werden, welches etwa Sulfat zu Sulfit reduziert. Möglicherweise geht diese Reduktion über die Ester. Bemerkenswert ist jedenfalls die hohe Konzentration an Thiolen und Disulfiden in den Wurzelspitzen aller Pflanzen, wo eine lebhaft enzymatische "Geschäftigkeit" zu vermuten ist. In diesem Zusammenhang sei auf die Entdeckung von anaeroben, beweglichen, gramnegativen Vibrionen mit polaren Geißeln aus sulfathaltigen Salzwässern von Oelfeldern durch J. W. Young hingewiesen. Das Fermentsystem dieser Organismen vermag unter H_2S -Bildung und CO_2 -Entwicklung Lactat, aber nicht Formiat in Carbonat zu verwandeln. Hier fungiert demnach die Milchsäure als Reduktionsmittel und das Sulfat als Oxydationsmittel.

Die Reduktion von Thioacetaldehyd zu Aethylmercaptan durch

Hefe (s.o.) wird wahrscheinlich durch das gleiche Pyridinenzym bewerkstelligt, welches den Acetaldehyd zu Aethylalkohol hydriert.

In der Natur kommen verschiedentlich Enzymsysteme vor, die den Wasserstoff von Kohlenhydraten und anderen Verbindungen auf Disulfide übertragen, wobei diese zu Thiolen reduziert werden. So haben Meldrum und Tarr in Hefe die Gegenwart des Warburg-Christian'schen Enzym-Coenzym-Systems nachgewiesen, welches Disulfidglutathion GSSG mittels Hexosemonophosphat zu GSH reduziert. Nach Baumgärtel vermag, wie schon erwähnt, der Fäulniserreger *Bac. putrificus verrucosus* Cystin zu Cystein zu reduzieren, wobei wahrscheinlich das gleiche Enzymsystem wie in der Hefe in Aktion tritt. Auch die Succinodehydrase, welche spezifisch auf Bernsteinsäure als Substrat eingestellt ist, kann den Wasserstoff dieser Dicarbonsäure auf Disulfide übertragen; Bersin konnte eine Hydrierung des Disulfidpapains mittels Succinodehydrase und Bernsteinsäure nachweisen.

Zwei in den Bakterien, Pilzen, und höheren Pflanzen weitverbreitete Enzyme, die Hydrogenase und die Ameisensäuredehydrase, katalysieren folgende Reaktionen:



Es bedeutet X einen Wasserstoffacceptor, also ein Oxydationsmittel, wie etwa der Schwefel des Sulfats, Sulfits, oder Thiosulfats.

Auf Grund neuerer Arbeiten ist anzunehmen, dass es sich bei der Ameisensäuredehydrase um ein System von Pyridin- und Flavinenzymen handelt. Bekanntlich sind diese Enzyme mit Wirkgruppen aus dem Vitamin B₂-Komplex in fast allen lebenden Zellen miteinander zum Zwecke eines gerichteten Wasserstofftransportes verknüpft.

Die Hydrogenase der Wurzelknöllchenbakterien *R. trifolii* vermag in Gegenwart von molekularem Wasserstoff Sulfat zum Sulfid zu reduzieren, wodurch es infolge FeS-Bildung mit den im Boden vorkommenden Eisensalzen zu einer Schwärzung des Bodens kommt; nimmt dieser Prozess einen grossen Umfang an, kommt es infolge Negativierung des Redoxpotentials bzw. Herabsetzung des Sauerstoffgehaltes im Boden zu einem Absterben der Wirtspflanze (Lee und Umbreit).

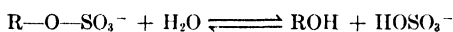
Schliesslich sind Enzyme bekannt geworden, welche den Wasser-

stoff von Thiolen auf ungesättigte Verbindungen zu übertragen vermögen. So erfolgt durch eine Redoxase des *Bac. coli commune* eine Hydrierung des Bilirubins zu Sterkobilinogen und des Phäophytins zu Phylloerythrin in Gegenwart von Cystein als Reduktionsmittel (Baumgärtel).

B. Sulfatasen

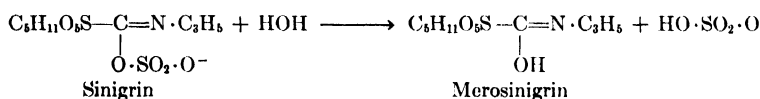
Die Bildung und Hydrolyse der in den Pflanzen gefundenen Schwefelsäureester wird von spezifischen Sulfatasen bewirkt. Hier sind auch noch zahlreiche Fragen trotz der umfangreichen Pionierarbeit von Neuberg u.a. zu lösen. Die Natur der Wirkgruppen dieser Fermente liegt immer noch im Dunkeln, obwohl die Reindarstellung durchaus im Bereich der derzeitigen Möglichkeiten liegt.

Die in *Aspergillus oryzae*, sowie in pflanzlichem und tierischem Material aufgefundenen Sulfatasen sind an der Einstellung des Gleichgewichtes folgender Reaktion beteiligt:



Es werden also Monoschwefelsäureester von Oxyverbindungen der verschiedensten Art (Phenole, Alkohole, Zucker) gespalten oder synthetisiert (Fromageot).

So spaltet die Myrosulfatase der Senfkörner bei optimal pH 5.4–7.4 aus dem Sinigrin die Schwefelsäure ab (Bussy, Neuberg):



Das Enzym kommt bei allen Cruciferen vor und fehlt bei Schimmelpilzen und Bakterien. Es ist zumeist vergesellschaftet mit der Thioglucosidase (das Gemisch hiess früher Myrosinase), welches die Hydrolyse der thioglucosidischen Bindung bewirkt. Die Reinigung der Myrosulfatase ist mittels Adsorptionsmethoden von Neuberg und v. Schoenebeck durchgeführt worden. Ausser dem Sinigrin werden auch Sinalbin und Glucocheirolin von der Myrosulfatase gespalten.

Ueber die Eigenschaften der Thioglucosidase ist kaum etwas bekannt geworden.

Die Chondrosulfatase einiger Bakterien, z.B. *B. proteus* und *B. pyocyanus* (Tanko), beschleunigt die Hydrolyse der Kohlenhydrat-schwefelsäureester, aus denen die tierischen Schleimsubstanzen

bestehen. Sie ist nicht identisch mit der Glucosulfatase, welche neben der Chondrosulfatase in *Bact. fluorescens non liquefaciens* in Bact. aufgefunden wurde. Die von Soda bearbeitete Glucosulfatase ist besonders reichlich bei Gastropoden zu finden und hat ein in der Nähe von 5 liegendes pH-Optimum; Borate und Phosphate sind starke Inhibitoren dieses Enzyms.

Die von Derrien entdeckte Phenolsulfatase wurde von Neuberg, der sie in der aus Schimmelpilzen gewonnenen Takadiastase nachwies, näher untersucht. Sie spaltet Indoxylschwefelsäure und die verschiedensten Phenolschwefelsäureester bei pH 7–9; zum Abfangen der gebildeten freien Säure muss beiden Versuchen CaCO_3 oder BaCO_3 zugesetzt werden (MgCO_3 herab merkwürdigerweise total).

Literatur

1. H. A. Abramson and L. F. Moyer, Electrokinetic phenomena. *J. Gen. Physiol.*, **21**, 729 (1938).
2. L. Ahlström, H. von Euler und J. Gernow, Ueber die Hydrierung des Schwefels durch Hefe und durch schwefelhaltige organische Stoffe. *Arkiv Kemi*, **18a**, Nr. 20 (1944).
3. S. Akabori und T. Kaneko, Ueber einen schwefelhaltigen Riechstoff aus "Shoyo," *Proc. Imp. Acad. Tokyo*, **12**, 131 (1936).
- 3a. S. Akabori und T. Kaneko, Ueber die Synthese von Methionol. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **14**, 1 (1939).
4. K. Akobe, Darstellung von *d*- und *l*- α -Oxy- γ -methiobuttersäure und damit ausgeführte Ernährungsversuche. *Z. physiol. Chem.*, **244**, 14 (1936).
5. F. E. Allison, S. R. Hoover and D. Burk, Respiration coenzyme. *Science*, **78**, 217 (1933).
- 5a. H. U. Amlong und G. Naundorf, Ein neues Verfahren der Wuchsstoffstimulation. *Ber. dtsh. bot. Ges.*, **59**, 32 (1941).
6. J. C. Andrews, Reduction of some sulfur compounds by intestinal microorganisms of dog. *J. Biol. Chem.*, **122**, 687 (1938).
7. M. L. Anson, Reactions of iodine and iodoacetamide with native ovalbumin. *J. Gen. Physiol.*, **23**, 321 (1940).
8. R. M. Archibald and P. B. Hamilton, Removal of canavanin from preparations of jackbean urease. *J. Biol. Chem.*, **150**, 155 (1943).
9. P. A. Ark, Action of some enzymes and amino acids on gallnuts. *Science*, **85**, 364 (1937).
10. D. J. Arnon, Vitamin B₁ and growth of green plants. *Science*, **92**, 264 (1940).
11. L. J. Audus and J. H. Quastel, Selective toxic action of thiosulfate on plants. *Nature*, **160**, 263 (1947).
12. J. Augier, Dates nouveaux sur les sucres des algues rouges. *C. r. stances acad. sci.*, **222**, 929 (1946).
13. E. Bach, Die Hemmung der Oxydation der Ascorbinsäure durch Senföl. *Z. Vitaminforsch.*, **11**, 1 (1941).
14. A. K. Balls and H. Lineweaver, Nature of groups responsible for activity of papain. *Nature*, **144**, 513 (1939).

15. R. Balks, Ueber die Bedeutung des Schwefels in der Pflanzenernährung. *Forschungsdienst Sonderh.*, **16**, 217 (1942).
16. H. H. Barber and R. R. Burrows, Formation of free sulfur from *l*-cystine by a soil bacterium. *Biochem. J.*, **30**, 599 (1936).
- 16a. G. Barger and F. P. Coyne, *Biochem. J.*, **22**, 1417 (1928).
17. H. K. Barrenscheen und T. von Valyi-Nagy, Die Methylierung durch pflanzliche und tierische Gewebe. *Z. physiol. Chem.*, **277**, 97 (1942).
18. E. S. G. Barron, Z. B. Miller and G. Kalnitsky, Oxidation of dithiols. *Biochem. J.*, **41**, 62 (1947).
- 18a. E. S. G. Barron, Z. B. Miller, G. R. Bartlett, J. Meyer, and T. P. Singer, Reactivation by dithiols of enzymes inhibited by lewisite. *Biochem. J.*, **41**, 69 (1941).
19. Tr. Baumgärtel, Zur Kenntnis der biologischen Gallenfarbstoffreduktion. *Klin. Wschr.*, **22**, 416 (1943).
20. Tr. Baumgärtel, Chlorophyllabbau im menschlichen Darmkanal. *Med. Monatsschr.*, **1**, 401 (1947).
21. H. Bergstermann und H. D. Lummer, Die Wirkung von Schwefelwasserstoff und seinen Oxydationsprodukten auf Bernsteinsäuredehydrase. *Arch. exp. Path. Pharm.*, **204**, 509 (1947).
22. K. Bernhauer, *Gärungschemisches Praktikum*. Berlin, 1936.
23. Th. Bersin, Die Beschleunigung der Dehydrierung von Mercaptoverbindungen durch Metalle. *Biochem. Z.*, **245**, 466 (1932).
24. Th. Bersin, und W. Logemann, Mercaptide des Selen und Tellurs. *Ann.*, **505**, 1 (1933).
25. Th. Bersin und W. Logemann, Ueber den Einfluss von Oxydations- und Reduktionsmitteln auf die Aktivität von Papain. *Z. physiol. Chem.*, **220**, 209 (1933).
26. Th. Bersin, Ueber Thiolverbindungen und Enzyme. *Erg. Enzymforsch.*, **4**, 68 (1935).
27. Th. Bersin, und H. Köster, Die Einwirkung von Aktivatoren, Hemmungskörpern und Destruktoren auf Urease. *Z. ges. Naturwiss.*, **1935**, 230.
28. Th. Bersin, H. Köster und H. Jusatz, Biochemische Beziehungen zwischen Ascorbinsäure und Glutathion. *Z. physiol. Chem.*, **235**, 12 (1935).
29. Th. Bersin, Die Bedeutung des Thiol-Disulfid-Systems für die Aktivität biochemischer Wirkstoffe. *Sitzber. Ges. Bef. ges. Naturw. Marburg*, **71**, 57 (1936).
30. Th. Bersin, *Kurzes Lehrbuch der Enzymologie*. Leipzig, 1938.
31. Th. Bersin und J. Steudel, Polarimetrische Untersuchungen über das Thiol-Disulfid-System. *Ber.*, **71**, 1015 (1938).
32. Th. Bersin, *Thiole und Disulfide*. Bamann-Myrbäck, *Die Methoden der Fermentforschung*, Leipzig, 1940, 422.
33. Th. Bersin, *Amidasen und Proteasen*. Nord-Weidenhagen, *Handbuch der Enzymologie*, Leipzig, 1940, 573.
34. Th. Bersin, *Effektoren der Enzymwirkung*. Nord-Weidenhagen, *Handbuch der Enzymologie*, Leipzig, 1940, 154.
35. Th. Bersin, H. G. Moldtmann, H. Nafziger, B. Marchand, und W. Leopold, Die synthetische Darstellung von Acetalphosphatiden. *Z. physiol. Chem.*, **269**, 241 (1941).
36. Th. Bersin, Die Bedeutung der Austauschadsorption für das biochemische Geschehen. *Naturwiss.*, **33**, 168 (1946).
37. F. Bicknell and F. Prescott, *The Vitamins in Medicine*. New York, 1947.
38. L. Binet et Weller, *Le glutathion*. Paris, 1937.

39. F. Binkley, Nature of serine dehydrase and cysteine desulfurase. *J. Biol. Chem.*, **150**, 261 (1943).
40. F. Binkley, W. P. Anslow and V. du Vigneaud, *J. Biol. Chem.*, **143**, 559 (1942).
41. F. Binkley and V. du Vigneaud, *J. Biol. Chem.*, **144**, 507 (1942).
42. F. Binkley, *J. Biol. Chem.*, **155**, 39 (1944).
43. J. H. Birkinshaw, W. P. K. Findley and R. A. Webb, *Biochem. J.* **36**, 526 (1942).
44. G. Blaurock, Bifiduszüchtung auf cystinhaltigen Nährböden. *Zbl. Bakt.*, **144**, 75 (1939).
45. F. Boas, *Dynamische Botanik*. München, 1942.
46. P. Bolomey, Le glutathion et la fermentation alcoolique. *Ann. Ferment*, **5**, 221 (1939).
47. J. Bonner and P. S. Devinian, *Am. J. Botany*, **26**, 661 (1939).
48. J. Bonner, Thiamin (vitamin B₁) and root growth. *Am. J. Botany*, **25**, 543 (1938).
49. J. Bonner and J. Greene, Vitamin P and growth of green plants. *Bot. Gaz.*, **100**, 226 (1938).
50. M. Bonner and J. Bonner, Influence of varied growth factors on growth of green plants. *Am. J. Botany*, **27**, 38 (1940).
51. H. Borsook, E. L. Ellis and H. M. Huffman, *J. Biol. Chem.*, **117**, 281 (1937).
52. H. Borsook, H. W. Davenport, C. E. P. Jeffreys and R. C. Warner, Oxidation and reduction of ascorbic acid *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **117**, 237 (1937).
- 52a. H. Borsook and J. W. Dubnoff, Formation of creatine in liver and kidney. *J. Biol. Chem.*, **134**, 635 (1940).
53. E. Brand, R. J. Block, and G. F. Cahill, Cystinuria. VI. *J. Biol. Chem.*, **119**, 681 (1937).
54. E. Brand, L. J. Saidel, W. H. Goldwater, B. Kassell and F. J. Ryan, Empirical formula of β -lactoglobulin. *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 492 (1943).
55. W. L. Brown, Threonine, serine, cystine and methionine content of peanut proteins. *J. Biol. Chem.*, **142**, 299 (1942).
56. G. B. Brown and V. du Vigneaud, Synthesis of S-(β -amino- β -carboxyethyl)-homocysteine. *J. Biol. Chem.*, **137**, 611 (1941).
57. H. A. Bruson and J. W. Eastes, Action of sulfuric acid on unsaturated isothiocyanates: mercaptothiazolines. *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 2011 (1937).
58. P. R. Burkholder and E. W. Sinnott, *Science*, **94**, Nr. 2433, Suppl. 9-10 (1941).
59. Bussy, *Ann.*, **34**, 223 (1840).
60. E. T. Butler, W. J. Robbins and B. O. Dodge, Biotin and the growth of *Neurospora*. *Science*, **94**, 262 (1941).
61. K. R. Butlin and M. E. Adams, Autotrophic growth of sulphate-reducing bacteria. *Nature*, **160**, 154 (1947).
62. L. Califano, Ueber Aktivierung der Coligärung. *Arch. Mikrobiol.*, **8**, 307 (1937).
63. J. R. Catch, A. H. Cook, A. R. Graham, and J. Heilbron, Synthesis of Methionine and related amino acids. *Nature*, **159**, 578 (1947).
64. Ch. J. Cavallito, J. S. Buck and C. M. Suter, *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 1950, 1952 (1944).
64. Ch. J. Cavallito *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 1032 (1945).
65. Ch. J. Cavallito, *J. Biol. Chem.*, **164**, 29 (1946).

66. Ch. J. Cavallito and J. H. Bailey, Antibactericidal compounds from *Asarum canadense*. I. *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 489 (1946).
67. P. Chaix et C. Fromageot, L'action de quelque dérivés du soufre sur la fermentation de la glucose par les bactéries propioniques. *Bull. soc. chim. biol.*, **18**, 1436(1938).
68. F. Challenger and A. A. Rawlings, Formation of organometalloid and related compounds by microorganisms. *J. Chem. Soc.*, **1937**, 868.
69. F. Challenger and P. T. Charlton, *J. Chem. Soc.*, **1947**, 424.
70. F. Challenger and M. I. Simpson, A precursor of the dimethyl sulphide evolved by *Polysiphonia fastigiata*. Dimethyl- β -propiothetine (dimethyl- β -carboxyethylsulphonium hydroxide) and its salts. *Biochem. J.*, **41**, xi (1947).
71. A. C. Chibnall, Amino acid analysis and the structure of proteins. *Proc. Roy. Soc., Ser.*, **B131**, 136 (1942).
72. L. Cioglia, Ueber das Vorkommen von Agar in inlandischen Algen. *Chem. Zentr.*, **II**, 916 (1940).
73. J. P. Conrad, Hydrolysis of urea in the soil by thermolabile catalysis. *Soil Science*, **49**, 253 (1940).
74. J. P. Conrad, Nature of the catalyst effecting the hydrolysis of urea in soils. *Soil Science*, **50**, 119 (1940).
75. P. B. Cowles, Alkyl sulfates: their selective bacteriostatic action. *Yale J. Biol. Med.*, **11**, 33 (1938).
76. F. Czapek, *Biochemie der Pflanzen*. 2. Aufl., Jena, 1920.
77. von Deines, *Naturwiss.*, **21**, 873 (1933).
78. C. E. Dent, Cystine and methionine contents of liver protein in acute hepatic necrosis. *Biochem. J.*, **41**, 314 (1947).
79. M. Derrien, *Bull. soc. chim. (IV)*, **9**, 110 (1911).
80. P. Desnuelle et C. Fromageot, La décomposition anaerobe du cystéine par le *Bacterium coli*. I. *Enzymologia*, **6**, 80 (1939).
81. P. Desnuelle, La décomposition anaerobe du cystéine par le *Bacterium coli*. II. *Enzymologia* **6**, 226 (1939).
82. P. Desnuelle, E. Wookey et C. Fromageot, Sur la décomposition anaerobe du cystéine et cystin par le *Propionibacterium pentosaceum*. *Enzymologia* **8**, 225 (1940).
- 82a. E. T. Dewar and E. G. V. Percival, Polysaccharides of carrageen. II. *J. Chem. Soc.*, **1947**, 1622.
83. K. Dittmer and V. du Vigneaud, Antibiotins. *Science*, **100**, 129 (1944).
84. R. Doerr und C. Hallauer, *Handbuch der Virusforschung*. Springer, Wien, 1944.
85. B. B. Drake, C. V. Smythe and C. G. King, Complexes of dehydroascorbic acid with three sulphhydryl compounds. *J. Biol. Chem.*, **143**, 89 (1942).
86. R. E. Eakin and E. A. Eakin, *Science*, **96**, 187 (1942).
87. S. V. Eaton, Influence of sulfur deficiency on the metabolism of sunflower. *Bot. Gaz.*, **102**, 536 (1941).
88. G. Ehrhardt, *Studien in der Penicillinreihe*. Vortrag Tagung Ges. dtsh. Chem. Hessen, Wiesbaden, 1948.
89. D. Ellis, *The Sulphur Bacteria*. Longmans, Green, London, 1931.
- 89a. J. A. Eldridge and F. S. Spring, Gliotoxin, Part I, Synthesis of 2-thio-3-methylindolo-1'-2'-1:5-hydantoin and its identification as a degradation product of gliotoxin. *J. Chem. Soc.*, **1949**, Suppl. Issue No. 1, 135.
90. H. von Euler, *Chemie der Enzyme*. Bergmann, München, 1934.

91. R. Feulgen und Th. Bersin, Zur Kenntnis des Plasmalogens. *Z. physiol. Chem.*, **260**, 217 (1939).
92. H. Fiedler, Entwicklungs- und reizphysiologische Untersuchungen an Kulturen isolierter Wurzelspitzen. *Z. Bot.*, **30**, 385 (1936).
93. F. G. Fischer, Niedermolekulare Ueberträger biologischer Oxydo-Reduktionen und ihre Potentiale. *Erg. Enzymforsch.*, **8**, 184 (1939).
94. A. Fleming, *Brit. Med. Bull.*, **2**, 1 (1944).
- 94a. K. Folkers, F. Koniuszy und J. Shavel, Jr., Alkaloids of *Erythrina*. XIV. *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 1083 (1944).
95. C. Fromageot et R. Grand, Sur les groupes actifs de la cystéine-desulfurase. *Enzymologia*, **11**, 81 (1943/45).
96. C. Fromageot et R. Moubasher, Sur la desulfuration fermentative du cystéine. *Enzymologia*, **2**, 331 (1938).
97. C. Fromageot et R. Moubasher, Sur la formation enzymatique de la hydrure du soufre hors des combinaisons organiques de soufre. *Enzymologia*, **2**, 121 (1937).
98. C. Fromageot et F. Chatin ger, Ein neues Enzym aus der Leber höherer Tiere: die Desulfuricase. *Chem. Zentr.*, **1**, 820 (1947).
99. C. Fromageot, Sulfatase. *Erg. Enzymforsch.*, **7**, 50 (1938).
100. C. Fromageot et R. Grand, Formation fermentative de l'alanin hors de cystéin. *Bull. soc. chim. France, Mém.*, **10**, 436 (1943).
101. C. Fromageot et Tchen Pau Kiun, Sur les groupes actives de la cysteinase du "Bacillus subtilis." *Bull. soc. chim. France, Mém.*, **10**, 436 (1943).
102. E. F. Gale and E. S. Taylor, Influence of penicillin on inhibition of assimilation of glutamic acid by *Staphylococcus aureus*. *Nature*, **158**, 676 (1946).
103. N. Gralén and T. Svedberg, Molecular weight of crotoxin. *Biochem. J.*, **32**, 1375 (1938).
104. L. Genevois et P. Cayrol, Combination des aldehydes avec Thioamin-derivées. *Bull. soc. chim. France* [5], **6**, 1223 (1939).
105. J. C. Ghosh and B. C. Kar, Oxidation of sulfhydryl compounds with hydroperoxide in the presence of inorganic catalysts. *J. Indian Chem. Soc.*, **14**, 249 (1937).
106. D. R. Goddard and M. P. Schubert, Action of iodoethyl alcohol upon thiol compounds and proteins. *Biochem. J.*, **29**, 1009 (1935).
107. D. Goldsmith and M. Tishler, Synthesis of *d,l*-methionine. *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 144 (1946).
108. S. Granick, *Plant Physiol.*, **12**, 471, 601 (1937).
109. W. Grassmann und H. Dyckerhoff, *Z. physiol. Chem.*, **179**, 41 (1928); **186**, 183 (1930).
110. D. E. Green, D. Herbert and V. Subrahmanyam, Carboxylase. *J. Biol. Chem.*, **138**, 327 (1941).
111. L. D. Greenberg and J. F. Rinehart, Influence of sulfhydryl and other reducing compounds on the decarboxylation of pyruvic acid by alkali treated yeast. *Proc. Soc. Exp. Biol., Med.* **43**, 495 (1940).
112. J. P. Greenstein, Studies on multivalent amino acids and peptides. X. *J. Biol. Chem.*, **124**, 255 (1938).
113. W. O. Gross, Lassen sich bei der praktischen bakteriologischen Diphtherie-diagnostik die dextrosevergärenden Pseudodiphtheriebakterien von den positiven Fällen abgrenzen? *Zbl. Bakt. Abt. I.* **149**, 348 (1942).
114. S. Gurin and C. F. Segal, Helianthates of esters of amino acids and polypeptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **58**, 2107 (1936).

115. J. D. Guthrie, Factors influencing the formation of ascorbic acid and glutathione in potatoes after treatment with ethylene chlorhydrin. *Contr. Boyce Thompson Inst.*, **9**, 17 (1937).
116. J. D. Guthrie, Availability of sulfate during synthesis of glutathione to potatoes treated with ethylene chlorhydrin. *Contr. Boyce Thompson Inst.*, **9**, 233 (1938).
117. P. György, D. B. Melville, D. Burl and V. du Vigneaud, Possible identity of vitamin H with biotin and coenzyme R. *Science*, **91**, 243 (1940).
118. P. György, C. S. Rose, R. E. Eakin, E. E. Snell and R. J. Williams, *Science* **93**, 477 (1941).
119. A. J. Haagen-Smit, J. G. Kirchner, C. L. Deasy and A. N. Prater, Chemical studies on pineapple (*Ananas sativus* Lindl). *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 1651 (1945).
120. P. Haas, Evolution of methyl sulfide from sea-weed. *Biochem. J.*, **29**, 1297 (1935).
121. F. S. Hammett and A. Reynolds, Disulfide from ammonium sulfate in the presence of mashed root-tips of *Phaseolus vulgaris*. *Science*, **86**, 498 (1937).
122. C. R. Harington and R. V. Pitt Rivers, *Nature*, **154**, 301 (1944).
123. G. J. Harper, Inhibition of penicillin in routine culture media. *Lancet*, **245**, 569 (1943).
124. C. R. Harington and T. H. Mead, Synthesis of cystine and glutamine containing peptides. *Biochem. J.*, **30**, 1598 (1936).
125. S. A. Harris, D. E. Wolf, R. Mazingo and K. Folkers, Synthetic biotin *Science*, **97**, 447 (1943).
126. H. W. Harvey, Substances influencing the growth of a diatom. *J. Marine Biol. Ass. United Kingdom*, **23**, 499 (1939).
127. A. Heffter, *Beitr. chem. Physiol. u. Pathol.*, **5**, 213 (1904).
128. A. Heffter, *Med. naturw. Arch.*, **1**, 81 (1907/1908).
129. L. Hellerman, V. R. Deitz and F. P. Chinard, Protein sulfhydryl groups and the reversible inactivation of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.*, **140**, Proc. 57 (1941).
130. L. Hellerman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **147**, 443 (1943).
131. G. Hesse, F. Reicheneder and H. Eysenbach, Die Herzgifte im Calotropis-Milchsaft, 2. Mitt. *Ann.*, **537**, 67 (1938).
132. G. Hesse, *Persönliche Mitteilung*.
133. E. M. Hill and W. Robson, New synthesis of methionine. *Biochem. J.*, **30**, 248 (1936).
134. F. Hoppe-Seyler und H. Thierfelder, *Handbuch der physiologischen und pathologischen chemischen Analyse*. 1924.
135. Hoffmann-Walbeck, Penicillin. *Pharmazie*, **1**, 97 (1946).
136. K. Hofmann, D. B. Melville and V. du Vigneaud, Characterization of functional groupings of biotin. *J. Biol. Chem.*, **141**, 207 (1941).
137. C. Y. Hopkins, Sulfur-containing substance from the seed of *Conringia orientalis*. *Canad. J. Res.*, **B16**, 341 (1938).
138. F. G. Hopkins and E. J. Morgan, Influence of thiol groups upon the activity of dehydrogenases. *Biochem. J.*, **32**, 611 (1938); Vgl. *Hopkins & Biochemistry*, Cambridge, 1949.
139. F. G. Hopkins, Autoxidizable constituent of cell. *Biochem. J.*, **15**, 286 (1921).
140. F. G. Hopkins and E. J. Morgan, Appearance of glutathione during the early stages of germination of seeds. *Nature*, **152**, 288 (1943).

141. M. J. Horn and D. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 234 (1940).
142. M. J. Horn and D. B. Jones, *J. Biol. Chem.*, **139**, 649 (1941).
- 142a. N. H. Horowitz, Methionine synthesis in *Neurospora*. Isolation of cystathionine. *J. Biol. Chem.*, **171**, 255 (1947).
143. S. F. Howell, I. D. Thayer and L. W. Jabaw, Introduction of radioactive sulfur (S^{35}) into the penicillin molecule by biosynthesis. *Science*, **107**, 299 (1948).
144. G. Ivánovics and S. Horváth, Raphanin, an antibiotic principle of *Raphanus sativus*. *Nature*, **160**, 297 (1947).
145. A. Janke, *Arbeitsmethoden der Mikrobiologie*. Steinkopff, Dresden, 1946.
146. A. Jarisch, Die Pharmakologie der Mistel. *Klin. Wschr.*, **18**, 145 (1939).
147. J. R. Johnson, W. F. Bruce and J. D. Dutcher, *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 2005 (1943).
148. W. G. M. Jones and S. Peat, Constitution of agar. *J. Chem. Soc.*, **1942**, 225.
149. B. Kassell and E. Brand, Distribution of sulfur in casein, lactalbumin, edestin and papain. *J. Biol. Chem.*, **125**, 435 (1938).
150. Z. Karaoglanov, Ueber die Herkunft des Schwefelwasserstoffes im Schwarzen Meer. *Oesterr. Chem. Ztg.*, **45**, 15 (1942).
151. T. H. Kennedy, Thioureas as goitrogenic substances. *Nature*, **150**, 233 (1942).
152. H. Killian, *Die Penicilline*. Berlin, 1946.
153. A. J. Kluyver and H. J. L. Donker, *Chemie der Zelle*, **13**, 134 (1926).
154. R. Knox, P. G. H. Gell and M. R. Pollock, Selecting effect of tetrathionate on bacterial culture media. *J. Hyg.*, **43**, 147 (1943).
155. H. A. Krebs and L. V. Eggleston, Biological synthesis of oxaloacetic acid from pyruvic acid and carbon dioxide. *Biochem. J.*, **34**, 1383 (1940).
156. F. Kögl and W. A. J. Borg, Ueber die Konstitution der Biotine, 39. Mitt. über pflanzliche Wachstoffs. *Z. physiol. Chem.*, **281**, 65 (1944).
157. E. F. Kohmann, Chemical components of onion vapors responsible for wound-healing qualities. *Science*, **106**, 625 (1947).
158. A. Korenzwit, Extraktion von Agar-Agar und die Gegenstrommethode. *Chem. J. Ser. B. (Russ.)*, **11**, 331 (1938); *Chem. Zentr.*, **1**, 2097 (1939).
159. A. Kozłowski, *Biochem. J.*, **20**, 1346 (1936).
- 159a. W. W. Krause, Zur Klinik und Pathologie der Knollenblatterschwammvergiftung (*Amanita phalloides*). *Pharmazie*, **2**, 465 (1947).
160. G. Lakon, Topographischer Nachweis der Keimfähigkeit der Getreidefrüchte durch Tetrazoliumsalze. *Ber. deut. bot. Ges.*, **60**, 299 (1940).
161. J. O. Lampen and W. H. Peterson, Biotin and *p*-aminobenzoic acid as growth factors for the acetone-butanol organism, *Clostridium acetobutylicum*. *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 2283 (1941).
- 161a. J. O. Lampen, M. J. Jones, *et al.*, Sulfur metabolism of *Escherichia coli*. *Arch. Biochem.*, **13**, 33, 47, 55 (1947).
162. Th. F. Lavine, Oxidation of cystine in nonaqueous media, VI. *J. Biol. Chem.*, **113**, 583 (1936).
163. C. A. Lawrence, *Science*, **99**, 15 (1943).
164. A. Lawson and C. Rimington, Antithyroidal activity of ergothionein, a normal constituent of blood. *Lancet*, **252**, 586 (1947).
165. S. B. Lee und W. W. Umbreit, Biologische Oxydation von molekularem Wasserstoff. *Zbl. Bakt., Abt. II*, **101**, 354 (1940).
166. M. Lemoigne, P. Monguillon et R. Désveaux, La reduction de l'acide nitreux par le cystéine et le glutathion. *C. r. séances acad. sci.*, **206**, 947 (1938).

167. H. B. Lewis, Chemistry and metabolism of sulfur compounds. *Ann. Rev. Biochem.*, **4**, 149 (1935).
168. F. Lieben, *Geschichte der physiologischen Chemie*. Wien-Leipzig, 1935.
169. V. G. Lilly and L. H. Leonian, Antibiotin effect of desthiobiotin. *Science*, **99**, 205 (1944).
170. H. Lindley and H. Phillips, Action of sulphites on the cystine disulphide linkages of wool. *Biochem. J.*, **41**, 34 (1947).
171. L. G. Loginowa, Die Adaptation von *Saccharomyces cerevisiae* zum Schwefeldioxyd. *Mikrobiol. (Russ.)*, **10**, 216 (1941).
172. J. W. H. Lugg, Preparation of some protein samples from fresh leaves of plants, and sulphur distributions of the preparations. *Biochem. J.*, **32**, 2114 (1938).
173. J. W. H. Lugg, ~~Amino~~ acids, tyrosine and tryptophan contents and the sulphur distributions (cystine plus cysteine and methionine contents), of some plant leaf protein preparations. *Biochem. J.*, **32**, 2123 (1938).
174. J. W. H. Lugg, Representativeness of extracted samples and efficiency of extraction of protein from fresh leaves of plants; and some partial analyses of whole proteins of leaves. *Biochem. J.*, **33**, 110 (1939).
175. J. F. Mackworth, Inhibition of thiol enzymes by lachrymators. *Biochem. J.*, **42**, 82 (1948).
176. N. S. R. Maloeuf, Nitroprusside reaction as detection of reduced glutathione. *Nature*, **138**, 75 (1936).
177. S. O. Mast, D. M. Pace and L. R. Mast, The action of sulfur on the strength of respiration and on the respiration quotient by *Chilomonas paramecium*. *J. Cellul. Compar. Physiol.*, **8**, 125 (1936).
178. P. Mazé, Uptake of minerals and resistance of plants against microbiological damages. *Int. Bull. Plant Protect.*, **16**, 20, 50 (1942).
179. A. Mazur and H. T. Clarke, Amino acids of some sea algae. *J. Biol. Chem.*, **123**, 729 (1938).
180. L. W. McElroy and T. H. Jukes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **45**, 296 (1940).
181. T. I. McMeekin, E. J. Cohn and M. H. Blanchard, Studies on the physical chemistry of amino acids, peptides and allied compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 2717 (1937); *C. r. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, **22**, 142 (1938).
182. N. U. Meldrum and H. L. A. Tarr, *Biochem. J.*, **29**, 108 (1935).
183. W. Menke and E. Jacob, Untersuchungen über das Protoplasma grüner Pflanzenzellen. *Z. physiol. Chem.*, **272**, 227 (1942).
184. W. Meusel und G. Orzechowski, Ueber die Behandlung der Knollenblätter-schwamm-Vergiftung mit Cholin. *Aerztl. Wschr.*, **1/2**, 961 (1947).
185. K. Meyer and E. Chaffee, Mucopolysaccharide acid of the cornea and possible relation to the spreading factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **43**, 487 (1940).
186. G. Mezzadrolì et V. Vicentini, L'influence de quelques substances sulfhydryle (cystine et glutathion) sur la reproduction des cellules de *Sacch. cerevisiae*. *Bull. assoc. chim.*, **54**, 929 (1937).
187. F. Micheel und H. Schmitz, Notiz über das *d,l*-Methioninsulfoxyd. *Ber.*, **72**, 518 (1939).
188. F. Micheel und H. Emde, Zur Kenntnis der Schlangengifte. *Z. physiol. Chem.*, **265**, 266 (1940).
189. F. Micheel und H. Schmitz, Das Verhalten von Sulfoxyden gegenüber Sulfit. *Ber.*, **72**, 992 (1939).
190. J. W. Mitchell, Plant hormones. *Ind. Eng. Chem., News Ed.*, **18**, 1071 (1940).

191. E. J. Morgan and E. Friedmann, *S*-Cysteininosuccinic acid. *Biochem. J.*, **32**, 2296 (1938).
192. M. Morgenstern, La synthèse de penicillin. *Presse Méd.*, **55**, 315 (1947).
- 192a. K. Mothes, Neuere Untersuchungen auf dem Gebiete des Eiweissstoffwechsels. *Forschungsdienst*, **5**, 219 (1938).
- 192b. K. Mothes, Stickstoffbilanz und Stickstoffverlust. *Planta*, **82**, 589 (1938).
193. C. Neuberg and P. Mayer, *Z. physiol. Chem.*, **44**, 498 (1905).
194. C. Neuberg und von Schoenebeck, *Biochem. Z.*, **265**, 223 (1933).
195. A. Neuberger, Action of acetylating agents on amino acids. *Biochem. J.*, **32**, 1452 (1938).
- 195a. W. J. Nickerson, Enzymatic control of cell division in microorganisms *Nature*, **162**, 241 (1948).
196. C. B. van Niel, *Arch. Mikrobiol.*, **3**, 1 (1931).
197. N. Nielsen and G. Johansen, Untersuchungen über biologische Stickstoffbindung. *C. r. trav. lab. Carlsberg. Sér. physiol.*, **23**, 173 (1941).
198. A. Niehammer, Wachstumsmöglichkeiten mikroskopischer Pilze auf Sulfitecellulose und Holzschleif sowie Sulfitablaugen. *Holz als Roh- u. Werkstoff*, **5**, 269 (1942).
199. G. T. Nightingale, L. C. Schermerhorn and W. R. Robbins, Influence of sulfur deficiency on metabolism of tomato plants. *Plant Physiol.*, **7**, 565 (1932).
200. S. S. Nenjukow, Ueber den Zusammenhang zwischen dem Chemismus der Pflanze und ihrer Stellung im System. *Priroda (Russ.)*, **28**, 34 (1939).
201. W. F. Opotzki and L. A. Bortnik, Zur Charakteristik von Agar-Agar aus Schwarzmeerphylophora. *Ukrain. Chim. J. (Russ.)*, **10**, 331 (1935).
202. W. I. Patterson and V. du Vigneaud, Synthesis of tetraduterohomocystine and dideuteromethionine. *J. Biol. Chem.*, **123**, 327 (1938).
203. R. A. Peters and R. W. Wakelin, Effect of some thiol compounds upon trypsin, chymotrypsin and chymotrypsinogen. *Biochem. J.*, **42**, xvi (1948).
204. L. B. Pett, Changes in amount of ascorbic acid and glutathione in storing and sprouting potatoes. *Biochem. J.*, **30**, 1228 (1936).
205. E. I. du Pont de Nemours & Co., U. S. Pat. 2,178,353.
206. R. Pratt and J. Dufrenoy, *Bact. Rev.*, **12**, 79 (1948).
207. B. Rajewski, Die Wirkung der kurzwelligen Strahlen auf Eiweisskörper. *Biochem. Z.*, **227**, 272 (1930).
208. L. Rane and Y. Subbarow, Choline, panthotenic acid and nicotinic acid as essential growth factors for *Pneumococcus*. *J. Biol. Chem.*, **134**, 455 (1940).
209. L. O. Raper, Reaction of thiol compounds with peroxidase and hydrogen peroxide (antithyroid activities of thiol compounds). *J. Biol. Chem.*, **164**, 527 (1946).
210. P. Reckendorfer, Die chemischen Grundlagen der fungiziden Wirkung des Weinbergschwefels. *Z. Pflanzenkrankh.*, **45**, 537 (1935).
211. H. Rinderknecht, J. L. Ward, F. Bergel and A. L. Morrison, Studies on antibiotics. *Biochem. J.*, **41**, 463 (1947).
212. A. Rippel-Baldes, *Grundriss der Mikrobiologie*. Berlin-Göttingen, 1947.
213. D. Rittenberg, A. S. Keston, R. Schoenheimer and G. L. Foster, Deuterium as indicator in metabolic studies, XIII. *J. Biol. Chem.*, **125**, 1 (1938).
- 213a. R. Robinson, in *The Chemistry of Penicillin*, Princeton Univ. Press, 1949; zit. nach P. Mitchell, *Nature*, **164**, 851 (1949).
214. J. Roche et M. Mourgue, Sur l'application de la réaction Sakaguchi aux

- proteins et acides α -guanidin qui dérivent des aminoacides naturels. *C. r. séances acad. sci.*, **222**, 1142 (1946).
215. L. Rosner, Reaction between iodoacetic acid and denatured ovalbumin. *J. Biol. Chem.*, **132**, 657 (1940).
216. K. Ritter, Der Aufbau der Eiweisskörper und die Eiweissstoffe des Weizenmehls. *Mühlenlabor.*, **9**, 1, 25 (1939).
217. A. F. Ross and W. M. Stanley, Sulfur and phosphorus content of tobacco mosaic virus (TMV). *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 535 (1939).
218. A. F. Ross, Purification and properties of alfalfa mosaic virus proteins. *Phytopathology*, **31**, 339 (1941).
219. J. I. Routh, Decomposition of cystine in aqueous solution. *J. Biol. Chem.*, **126**, 147 (1938).
220. J. I. Routh, Decomposition of cystine in aqueous solution. *J. Biol. Chem.*, **130**, 297 (1939).
221. J. Runnström und E. Sperber, Zur Kenntnis der Beziehungen zwischen Permeabilität und Stoffwechsel der Hefezelle. *Biochem. Z.*, **298**, 340 (1938).
222. A. M. A. van Santen und V. J. Koningsberger, Pflanzenwuchsstoffe der Biosgruppe. *Tab. biol.*, **17**, 241 (1939).
223. A. Sartory et J. Meyer, Diagnose différentielle de la group coli-paratyph avec une réaction de plombe aux milieu contenant du hyposulfite ou cystin. *C. r. séances acad. sci.*, **213**, 279 (1941).
224. A. E. Scharpenak und G. P. Jeremin, Ueber den Methioningehalt der Nahrungsproteine. *Ref. Chem. Zentr.*, **I**, 2287 (1937).
225. Schering, A. G., Herstellung von Glutation aus Hefe, DRP 694,546. *Ref. Chem. Zentr.*, **II**, 1939 (1940).
226. P. W. Schmidt und U. Marquardt, Ueber den antimykotischen Effekt ätherischer Oele von Lauchgewächsen und Kreuzblütlern auf pathogene Hautpilze. *Zbl. Bakt., Abt. I*, **138**, 104 (1936).
227. A. Schöberl, *Ann.*, **111**, 507 (1933); **522**, 97 (1936).
228. A. Schöberl und Th. Hornung, Ueber die Einwirkung von Alkalien auf Cystin und Cystinderivate. *Ann.*, **534**, 210 (1938).
229. A. Schöberl, Anlagerung von Sulfhydrylcarbonsäuren an ungesättigte Säuren und eine neue Synthese von Lanthionin. *Chem. Ber.*, **80**, 379 (1947).
230. A. Schöberl und R. Hamm, Ueber die α -Amino- β -rhodanpropionsäure und über die Umsetzung zwischen Cystin und Kaliumcyanid. *Chem. Ber.*, **81**, 210 (1948).
231. A. Schöberl und A. Wagner, Eine neue Synthese von Cystein und Cystin. *Naturwiss.*, **34**, 189 (1947).
232. G. Schramm, Ueber die Spaltung des TMV und die Wiedervereinigung der Spaltstücke zu höhermolekularen Proteinen. *Z. Naturforsch.*, **2b**, 112 (1947).
233. Semmler, *Arch. Pharm.*, **230**, 434 (1892).
234. C. Setterstrom, P. W. Zimmerman and W. Crocker, Effect of low concentrations of sulfur dioxide on yield of alfalfa and *Cruciferae*. *Contr. Boyce Thompson Inst.*, **9**, 179 (1938).
235. C. Setterstrom and P. W. Zimmerman, Factors influencing susceptibility of plants to sulfur dioxide injury, I. *Contr. Boyce Thompson Inst.*, **10**, 155 (1939).
236. C. E. Skinner and A. E. Muller, Cystine and methionine deficiency in fungus proteins. *J. Nutrit.*, **19**, 333 (1940).

237. E. B. Slack, Nitrogenous constituents of the potato. *Nature*, **161**, 211 (1948).
238. L. D. Small, J. H. Bailey and Ch. J. Cavallito, Alkyl thiosulfates. *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 1710 (1947).
239. E. L. Smith and A. E. Bide, Biosynthesis of penicillins. *Biochem. J.*, **42**, xvii (1948).
240. C. V. Smythe and D. Halliday, *J. Biol. Chem.*, **142**, 387 (1942).
241. E. E. Snell, B. L. Hutchings and W. H. Peterson, Microbiological assay for biotin. *J. Biol. Chem.*, **142**, 913 (1942).
242. R. Y. Stanier, Marine agar-digesting bacteria. *J. Bact.*, **42**, 527 (1941).
243. R. L. Starkey and K. M. Wight, Final report of the American Gas Association (1945).
244. R. A. Steinberg, Effect of trace elements upon the growth of *Aspergillus niger* with amino acids. *J. Agr. Research*, **64**, 455 (1942).
245. M. Stephenson, *Bacterial Metabolism*. Longmans, Green, London, 1930.
246. D. Stetten, *J. Biol. Chem.*, **144**, 501 (1942).
247. A. Stoll und E. Seebeck, Ueber Alliin, die genuine Muttersubstanz des Knoblauchöls. *Experientia*, **3**, 114 (1947).
248. A. Stoll und E. Seebeck, Allium-Verbindungen, I. Alliin, die wahre Muttersubstanz des Knoblauchöls. *Helv. Chim. Acta*, **31**, 189 (1948).
249. B. Sullivan and M. Howe, *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 2742 (1937).
250. B. Sullivan, M. Howe and F. D. Schmalz, Presence of glutathione in wheat sprouts. *Cereal Chem.*, **13**, 665 (1936).
251. J. L. Svirbely, Vitamin C investigations on rats. *Biochem. J.*, **32**, 467 (1938).
252. R. E. Swain and A. B. Johnson, Effect of small concentrations of SO₂ on the development of wheat. *Ind. Eng. Chem.*, **28**, 42 (1936).
253. B. Tanko, Spaltung der Glucose-Schwefelsäure und Saccharose-Schwefelsäure durch Bakteriensulfatase. *Biochem. Z.*, **247**, 486 (1932).
254. Y. Takayama und Y. Tsuchiya, Ueber Methionin und seine Derivate. *J. Agric. Chem. Soc. Japan Bull.*, **17**, 48, 61 (1941).
255. H. Tarver and C. L. A. Schmidt, *J. Biol. Chem.*, **130**, 67 (1939).
256. W. G. Templeman and N. Pollard, *Am. Bot.*, **5**, 133 (1941).
257. H. Theorell, Einige neue Untersuchungen über Cytochrome, Peroxydasen und Katalasen. *Erg. Enzymforsch.*, **9**, 231 (1943).
258. M. D. Thomas and G. R. Hill, Effect of sulphur dioxide in the atmosphere on the assimilation and respiration of alfalfa. *Plant Physiol.*, **12**, 309 (1937).
259. M. D. Thomas, *Newsweek*, Dec. 29 (1947).
260. R. C. Thompson and W. F. Kosar, *Science*, **87**, 218 (1938).
261. A. Todrick and E. Walker, Reaction of cysteine with allyl isothiocyanate. *Biochem. J.*, **31**, 297 (1937).
262. G. Toennies and Th. F. Lavine, Oxidation of cystine in nonaqueous media, VI. *J. Biol. Chem.*, **113**, 571 (1936).
263. G. Toennies, Interrelation between thiourea, cysteine and related disulfides. *J. Biol. Chem.*, **120**, 297 (1937).
264. G. Toennies, Sulfur-containing amino acid, methionine. *Growth*, **1**, 337 (1937).
265. G. Toennies, Oxidation of cysteine in nonaqueous media. *J. Biol. Chem.*, **122**, 27 (1937).
266. G. Toennies, Map of the natural amino acids. *Science*, **97**, 492 (1943).
267. G. Toennies and J. J. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 849 (1945).

268. M. V. Tracey, Leaf protease of tobacco and other plants. *Biochem. J.*, **42**, 281 (1948).
269. A. G. van Veen, Können Petchbohnen Djenkolvergiftungen verursachen? *Geneesk. Tijds. Nederl. Ind.*, **78**, 2619 (1938).
270. A. G. van Veen und A. J. Hijman, *Rec. trav. chim.*, **54**, 416, 493 (1935).
271. V. du Vigneaud and W. I. Patterson, Synthesis of djenkolic acid. *J. Biol. Chem.*, **114**, 533 (1936).
272. V. du Vigneaud, Studies on homocysteine. *Nucleus*, **15**, 83, 86, 92 (1938).
273. V. du Vigneaud, J. P. Chandler, A. W. Moyer and D. M. Keppel, Effect of choline upon ability of homocysteine to substitute alimentary methionine. *J. Biol. Chem.*, **131**, 57 (1939).
274. V. du Vigneaud, K. Hofmann, D. B. Melville and J. R. Rachele, Preparation of free crystallized biotin. *J. Biol. Chem.*, **140**, 763 (1941).
275. V. du Vigneaud, *Harvey Lectures*, **38**, 39 (1942/43).
276. V. du Vigneaud, Structure of biotin. *Science*, **96**, 455 (1942).
277. V. du Vigneaud, Desthiobiotin. *Science*, **98**, 497 (1943).
278. V. du Vigneaud, G. W. Kilmer, J. R. Rachele and M. Cohn, *J. Biol. Chem.*, **155**, 645 (1944).
279. H. Waelsch, P. Owades, H. K. Miller and E. Borek, Glutamic acid anti-metabolites—sulfoxide derived from methionine. *J. Biol. Chem.*, **166**, 273 (1946).
280. H. Waelsch and E. Borek, *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 2252 (1939).
281. Th. Wagner-Jauregg und E. F. Möller, Aktivierung der enzymatischen Dehydrierung des Alkohols durch Glutathion. *Z. physiol. Chem.*, **236**, 222 (1935).
282. Th. Wagner-Jauregg, Biochemische Kropfforschung und moderne Arzneimittelbehandlung der Thyreotoxikosen (Hyperthyreosen). *Med. Klinik*, **41**, 433 (1946).
283. O. Warburg, *Wasserstoffübertragende Fermente*. Saenger, Berlin, 1948.
284. R. Weidenhagen und Pao-chung Lu, Ueber Beziehungen zwischen Vitamin C und enzymatischer Rohrzuckerspaltung. *Z. Wirtschaftsgr. Zuckerind.*, **86**, 240 (1936).
285. A. Weidinger, Eine quantitative Methode zur Isolierung des *l*-Cystins aus Keratin (Rosshaar). *Rec. trav. chim.*, **56**, 562 (1937).
286. G. Wendt, Ueber den Thiozucker der Hefe. *Z. physiol. Chem.*, **272**, 152 (1942).
287. P. M. West und P. W. Wilson, Biotin als ein Wachstumsfaktor für Wurzelknöllchenbakterien. *Enzymologia*, **8**, 152 (1940).
288. H. Wieland und B. Witkop, Ueber die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes *Ann.*, **543**, 171 (1940).
289. H. Wieland und F. Lynen, Ueber die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes. *Ann.*, **548**, 1 (1941).
290. S. H. Wilson, Natural occurrence of polythionic acids. *Nature*, **148**, 502 (1941).
291. K. T. Wieringa, Bacillus Agar-exedens, eine neue, Agar abbauende Species. *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.*, **7**, 121 (1941).
292. S. Winogradsky et H. Winogradsky, *Ref., Chem. Zentr.*, **I**, 1387 (1942).
293. A. O. Winter, Versuche und Gesichtspunkte bezüglich der Biologie der Sulfitablauge. *Svensk Papperstidn.*, **43**, 212 (1940).
294. K. Winterfeld und M. Rink, Konstitution des Viscotoxins. *Ann.*, **561**, 186 (1949).

295. J. L. Wood and V. du Vigneaud, New synthesis of cystine. *J. Biol. Chem.* **131**, 267 (1939).
296. G. E. Woodward and E. F. Schroeder, Reaction of cystine with acetone. *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 1690 (1937).
297. D. W. Woolley and W. H. Peterson, *J. Biol. Chem.*, **122**, 213 (1937).
298. J. W. Young, Reduction of sulfates by sprouts. *Canad. J. Res.*, **B14**, 49 (1936).
299. H. Zahn, Ueber die Einwirkung von Phenolkörpern auf Faserkeratine. *Z. Naturforsch.*, **2b**, 286 (1947).
300. E. Ziegler, Improvement of dough. *Cereal Chem.*, **17**, 551 (1940).
391. L. Zechmeister and J. W. Sease, Blue fluorescing compound, terthienyl, isolated from marigolds. *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 273 (1947).

CHEMICAL CHANGES IN THE HARVESTED TOBACCO LEAF*

Part II. Chemical and Enzymic Conversions during Fermentation and Aging

By WALTER G. FRANKENBURG, *Lancaster, Pennsylvania*

This report is dedicated to the memory of BERNHARDT G. MEYER, late president of the General Cigar Company, whose foresight and interest initiated scientific work on cigar tobacco in this company in 1940.

CONTENTS

I. Chemical Changes Caused by Shed Curing.....	326
II. Description of the Fermentation and Aging Process...	327
A. Types of Processing.....	327
B. External Symptoms of the Fermentation.....	333
1. Qualitative Changes.....	333
2. Quantitative Effects.....	335
III. Chemical Changes in Tobacco Leaves Caused by Fermentation and by Aging.....	357
A. Analytical Methods.....	357
B. The Sweat of Cigar Leaf Tobaccos. Techniques of Cigar Leaf Fermentation ..	358 358
C. Analytical Results.....	361
1. Loss of Weight.....	361
2. Changes of Non-nitrogenous Leaf Components..	363
3. Insolubilization of Water-Soluble Leaf Components ..	375
4. Nitrogenous Compounds.....	376
5. Summary of the Chemistry of Cigar Leaf Fermentation..	398
D. Aging of Flue-Cured Cigarette Tobacco ..	399
1. Composition Prior to Aging ..	399
2. Technique of Aging.....	400
3. Analytical Results.....	401
IV. Hypotheses Concerning the Causative Agents of Tobacco Fermentation	409
A. The Problem.....	409
B. The Development of Various Hypotheses ..	409
1. First Period: 1858-1900.....	409
2. Second Period: 1901-1933.....	412
3. Third Period: 1935 up to the Present.....	415
C. The Present Picture.....	425
1. Relationship between the Various Mechanisms.....	425

* Part I of this report appeared in *Advances in Enzymology*, Volume VI, pp. 309-387, 1946.

2. Presumable Mechanisms of Some Individual Conversions Occurring in Fermentation and Aging.....	428
V. Effect of Fermentation on Smoking Properties.....	433
References.....	434

I. Chemical Changes Caused by Shed Curing

In Part I (59), a survey was presented on the chemical composition of the harvested tobacco leaf, and on the chemical conversions that occur in the leaves when they are subjected to the drying or curing* process immediately after their removal from the field. The pattern of these conversions is determined predominantly by those enzymes which remain active in the leaf tissues throughout the curing phase. This first phase of tobacco processing includes a starvation period followed by the death of the leaves. A considerable fraction of the leaf proteins undergo hydrolysis with the simultaneous appearance of amino acids, amides, and ammonia compounds in the form of water-soluble split-products; the polysaccharides are converted, again by hydrolysis, to simple sugars; small amounts of the pectins are partially attacked and broken up into lower molecular compounds such as pectic acid, uronic acid, and methyl alcohol. All these and some additional minor hydrolytic conversions differ basically from the chemical metabolism of the living leaf by the absence of synthetic processes, including the assimilation of carbon dioxide. Because of the lack of counterbalancing reactions, the hydrolytic processes of disintegration dominate the chemical conversions in the curing leaf.

Parallel to this one-sided trend in favor of lower molecular split-products, an additional set of chemical changes develops in the leaves with the progress of curing. The dynamic equilibrium between oxidative and reductive processes, as it was established in the living leaf, is thrown off balance, due to a drastic weakening of the reductive factors within the leaf tissues. As a result, the *oxidation* of certain leaf components becomes a major effect of the curing process simultaneously with, and in the wake of, the hydrolytic reactions. The carbohydrates are among the first compounds to be subjected to oxidation obviously owing to the influence of the same enzyme complex that had sustained the respiration of the living leaf. The transformation of malic acid into citric acid, a characteristic effect of the curing proc-

* The term "curing," sometimes used loosely to designate the entire processing of tobacco, is applied here exclusively to the phase of "shed curing" which covers the various methods employed for the first phase of tobacco treatment, such as air, flue, fire, and sun curing.

ess, is probably interrelated with the carbohydrate oxidation via a set of reactions closely related to the tricarboxylic acid cycle (169, 217). Gradually, the oxidative actions spread further, involving additional compounds, such as other organic acids, phenols, polyphenols, and some of the resinous components of the leaves. Concurrently, chlorophyll disappears by a process the chemical nature of which is unknown.

These are the principal transformations which take place in the "air curing" of tobacco leaves, as far as our present knowledge goes. In "flue curing," as applied to certain types of cigarette tobacco, the oxidative reactions are kept to a minimum by subjecting the tobacco to a drastic temperature increase. The latter is timed with the progress of curing at such a rate that the enzymes catalyzing the oxidative conversions are inactivated at the appropriate moment (3,5,24,41,139, 173,232,247,248).

II. Description of the Fermentation and Aging Process

All these chemical effects of shed curing constitute preparatory rather than decisive steps on the way from the green tobacco leaf to a satisfactory and industrially acceptable smoking tobacco. Without a further specific treatment, even well-cured cigar, cigarette, or pipe tobaccos are still unfit to be smoked, at least as far as the standards of conscientious manufacturers go. Such leaves develop on burning a pungent and irritating smoke which has a harsh and bitter taste and which obliterates the agreeable effects of any aroma compounds that may be present in the smoke among the products of combustion and of dry distillation.

The experience of the trade over many decades has taught that tobacco—and this holds for every known type—has to be subjected to *one or more additional specific operations* in order to yield a product which, on burning, develops a mild and aromatic smoke, free of the pungent ingredients characterizing the smoke of merely shed-cured tobaccos.

A. TYPES OF PROCESSING

These additional methods of processing vary considerably from one tobacco type to the next. Table I presents a survey on several typical operations as they are applied to various kinds of tobaccos; they range from the mild "aging," which has been developed for the fluo-

TABLE I
PROCEDURES OF FERMENTATION AS APPLIED TO VARIOUS TYPES OF TOBACCO

No.	Tobacco type	Usual name of procedure	Type of tobacco units (Nos. refer to Table II)	Moisture content of tobacco %	Conditions of moisture surrounding room		Peak temp. reached by tobacco, °C.	Duration	Loss of dry weight of tobacco, %
					Temp. at start, °C.	Relative humidity, %			
(1)	<i>Flue-cured</i> Old Belt South Carolina Eastern N. Carolina Georgia Florida <i>Fire-cured</i> Virginia Eastern District Western District Henderson Stemming <i>Air-cured</i> <i>Light Types</i> Burley Southern Md.	<i>Aging</i> “	4 4	10-13 13-16	“ “	“ “	35 “	1.5-3 yrs. “	None to 1 2-4
(2)	<i>Air-cured</i> <i>Dark Types</i> One Sucker Green River Virginia Suncured	<i>Aging</i>	4	11-18	“	“	40	1.5-3 yrs.	2.5-4.5
(3)	<i>Foreign cigarette</i> Oriental types (including Russian)	<i>Aging or Fermentation</i>	3 or 5	16-25	“	“	50	3-5 mos.	2.5-6

No.	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
(4)	<i>Cigar wrapper</i> Conn. Valley Shade Georgia Shade Florida Shade	<i>Bulk sweat</i> followed by <i>Mulling</i> followed by <i>Aging</i>	6 Loose in boxes 3	25-30 20-22 17-25	26 25 25	70 65 70	40-50 30 25-27	10-30 days incl. 2 or 3 rebulk- ings 3-4 wks. Several mos.	1-2 1-2 2-3 4-7 total
(5)	<i>Cigar wrapper</i>	First <i>Bulk sweat</i> Second <i>Bulk sweat</i>	6 7	23-25 21-23	Normal seasonal changes of tropical climate	50-54 53-55	4-6 days, 10 days, 3 wks. Several mos. incl. rebulking with increase of bulk sizes	6-10 total	
(6)	<i>Cigar binder</i> Conn. Broadleaf Conn. Havana Seed Southern Wisconsin Northern Wisconsin N. Y. Havana Seed Penn. Havana Seed Georgia Sun-Grown Florida Sun-Grown	<i>Bulk sweat</i> followed by <i>Natural sweat</i> followed by <i>Resweat</i>	6 1 1	25-30 18-22 15-30	25-30 Normal seasonal changes 40-45	65-80 Follows seasonal changes (33) 48	3-5 wks. 1-3 yrs. 1.5-8 mos. incl. repeated "shak- ing operations"	2-4 1-5 8-17 total	
(7)	<i>Cigar filler</i> Penn. Seedleaf Ohio Fillers Gebhardt Zimmer Dutch Puerto Rican	<i>Bundle bulk</i> <i>sweat</i> followed by <i>Natural sweat</i> followed by <i>Resweat</i>	2 to 6 1 1	23-27 16-22 15-50	25-45 Normal seasonal changes 60-70	70-85 35 45-55	3-5 wks. 1-3 yrs. 1.5-10 mos.	2-4 1-6 7-10 10-20 total	

TABLE I (concluded)

No.	Tobacco type (1)	Usual name of procedure (2)	Type of tobacco units (Nos. refer to Table II)	Conditions of			Peak temp. reached by tobacco, °C.	Duration (8)	Loss of dry weight of tobacco, % (9)
				Moisture content of tobacco at start, %	Temper- ature, °C.	Rela- tive humid- ity, %			
(8)	<i>Cigar filler</i> French German Austrian Italian Cuban (Havana.) <i>Fire-cured</i> <i>Italian cheeroots</i>	Series of <i>Bulk sweats</i>	7 then 5	25-30	Normal seasonal changes of winter and of spring (-5 to +25)	45-60	2-3 mos. Started in large bulks; rebulking in bulks of de- creasing size	12-18	
(9)	<i>Filler leaf</i> for short filler cigars <i>Stemming grades</i> for scrap chewing	<i>Bulk sweat</i> in bundles	2 to 6 or 7	25-30	Normal seasonal changes of winter and of spring (-5 to +25)	45-60	2-3 mos. Started in large bulks; rebulking in bulks of de- creasing size	12-18	
(10)	<i>Snuff tobacco</i>	<i>Aging</i> followed by <i>Fermentation</i>	4 4	18-20 35-50	Normal seasonal changes of Southern U. S. (5-35)	Follows seasonal changes (35) 55	3 yrs. Several mos. with consecu- tive turnings	16-18	
(11)	<i>Snuff tobacco</i>	<i>Bulk sweat</i>	7	35-50	Normal seasonal changes of Southern U. S. (5-35)	50-70	Several mos. with consecutive "rebulkings"	16-18	

TABLE II
 TYPES OF UNITS USED IN THE AGING, SWEATING, AND FERMENTATION OF VARIOUS TOBACCO TYPES

No.	Name	Description	Average dimensions in feet (length, width, height)		Volume in:		Wt. of tobacco in		Packing density, lb. per cu.ft.	Total volume occupied by tobacco, %
			Cu.ft.	Liters	Lb.	Kg.				
(1)	Case	Rectangular wooden box	3	2 5 × 2 5	18 8	450	250	112 5	13.3	23.4
(2)	Bundle	Package, wrapped with paper, burlap, etc.	4.2	2.5 × 2.5	26	700	400	180	15.4	25.7
(3)	Bale, cigar wrapper tobacco	Rectangular package with cane mat or similar material as casing	Variable	Various shapes, loose hands of tobacco	Variable	Variable	50-70	23-32	Variable	Variable
(3a)	Bale, Turkish tobacco	As above, burlap wrapping	2 × 2.6 × 1		6 7	182	165	74	24.3	40.5
(4)	Hogshead	Cylindrical barrel-shaped container, made of lightweight thin staves	4	4 to 4 5 height	53 3	1,440	1,000	450	18.8	31.2
(5)	Small bulks (piles)	No container except holding frames	10 × 2 8 × 6 ^a		169	4,560	2,230	1000	13.2	21.9
(6)	Medium-sized bulks	No container except holding frames	10 × 2 8 × 5 ^a		140	3,800	2,230	1000	15.9	26.3
(7)	Large bulks	Supporting board platform on sides and on back	14 × 5.5 × 8		620	16,700	6,000	2700	9.7	16.1
			18 × 7 × 9 3 ^a		1150	31,000	13,380	6000	11.6	19.4
			18 × 7 × 8 0 ^a		1000	27,000	13,380	6000	12.7	22.2

^a The two values listed for (5) and (7) each refer to the dimensions of the bulks before and after fermentation.

cured, fire-cured, and some air-cured types of cigarette tobaccos, to the drastic "sweat" procedures employed for the processing of filler-type cigar tobaccos and, in a further intensified form, for certain snuff tobaccos. In Table II, the kinds of units are listed in which the various tobacco types are being processed.

In a rather vague way, the name "fermentation" is being applied to these procedures of tobacco processing, except that it is rarely used for the aging process. The term "fermentation" was introduced some eighty years ago by Nessler (147) and is somewhat unfortunate. Contrary to its implication and to some early surmises (119), the chemical changes occurring at this stage in the tobacco leaves have little, if anything, in common with the alcoholic fermentation of vegetable materials. Even if applied in the general sense as a chemical conversion of organic materials under the influence of microorganisms, the term is not fully appropriate; as we shall see later, the extent to which bacteria and fungi are essential for the tobacco processing is still a disputed question (see Sect. IV).

In the typical aging of flue-cured cigarette tobaccos (45,68), the tobacco is stored, mostly in hogsheads, over several years in the form of tightly compressed masses of rather dry leaves.

The moisture content of 10-13% (Table I, No. 1, Column 4) in which flue-cured tobacco is subjected to aging corresponds to a condition in which the leaves "feel" very dry but in which they still possess enough pliability to stand cautious handling without excessive breakage. Most of the water corresponding to this moisture content seems to be bound to the proteins, pectins, and other colloidal leaf components in the form of "swelling" water.

Little heat, if any, is generated within these masses during the entire aging process. The temperature of the tobacco follows closely the seasonal changes of the storage rooms without appreciable deviations (except a certain lag caused by the thermal inertia of the compressed masses of packed leaves). The losses of dry weight of these flue-cured tobaccos as incurred over the aging period remain small, ranging from negligible amounts to one to two per cent. In the aging of air-cured tobacco types, the losses of weight are larger but rarely exceed 3 to 4%.

The "aging" of air-cured cigarette tobaccos, listed as No. 2 in Table I, represents, chemically, a process intermediate between the typical aging of flue-cured types and the more intensive "sweat" of cigar tobaccos.

The *sweat processes* (Table I, Nos. 4 to 11), on the other hand, are characterized by high initial moisture contents of the tobacco (up to 50%), by the generation of considerable amounts of heat within the sweating units (bundles, bulks, cases) of tobacco, and by losses of dry weight in amounts from 10 to 20%. In its more refined modifications, the sweat process is carried out in successive stages (Table I, Nos. 4, 6, 7, and Section IIIB).

Between these two basic principles of tobacco processing there exists a wide range of intermediate and diversified methods of fermentation. These individual methods are modulated according to the types of tobacco and the desired endproducts, adapted to the changing character of the annual crops, and varied in conformity with the traditions, experience, and economic considerations of the individual manufacturers.

An enumeration and description of all the special forms of tobacco treatment could hardly serve the purpose of this survey. Instead, we shall attempt here first to point out the common and *characteristic features of the tobacco fermentation* and to discuss then, in more detail, the evidence which has been gathered on the *chemical background* of the two processes of *sweat* and of *aging*. Besides representing the two extremes of fermentation, these two processes are the only ones that have been studied in detail from a scientific angle.

B. EXTERNAL SYMPTOMS OF THE FERMENTATION

1. Qualitative Changes

The fact that tobacco leaves show a much *improved smoking quality* (a corresponding improvement of the "taste" is obtained with chewing and snuff tobaccos) after their proper aging or fermenting is closely related to the manifold chemical changes which occur in their tissues during these treatments. This point will be discussed in more detail later after an outline has been given of our present knowledge concerning the nature of these chemical conversions.

Parallel with the progress of aging or fermentation, the response of the tobacco leaves is manifested by various symptoms. Their *odor, color, and texture* change in a characteristic way. Skilled tobacco experts judge from these effects the speed at which the processing of the leaves advances.

(a) **Aroma.** The odor of flue-cured tobacco develops from a "green," hay-like stage through a rather horehound-like, sometimes rancid, phase into the fruity, spicy, and mellow aroma of the fully aged leaf (45). Cigar tobaccos initially have a pungent and "raw" smell that gradually gives way, with the progress of the sweat, to an aromatic, partly ammoniacal, aroma. These odors of the leaves at the various stages of processing are distinctly different from the odors they develop on smoking, but nevertheless an obvious parallelism exists between the improvement of both. As long as these qualitative effects cannot be correlated to concise and quantitative chemical data, the changes of the tobacco odor, as important as they are for the industrial practice, can contribute but little to a better understanding of the underlying chemical conversions. It is even questionable whether the compounds that cause the desirable aroma of the leaves are actually formed as a result of the fermentation, or whether they were present in the leaves from the very start and merely remained hidden due to the presence of malodorous or irritating substances removed in the later stages of the fermentation.

(b) **Color.** Another sign displayed by a properly aging or fermenting tobacco leaf is a characteristic *change of color*. As a rule the leaves assume more uniform, duller, and darker shades during the processing. Flue-cured tobaccos turn from a "flashy yellow" into a less lively orange to reddish yellow. Cigar filler tobaccos develop increasingly darker shades of brown which lack the glossy luster of the fermented leaves. Just as the changes of odor, these mutations of color are significant but purely qualitative effects the analysis of which would require a better knowledge of the chemical mechanism responsible for the observed external changes.

(c) **Texture.** The same applies for the changes of the *leaf texture* accompanying the fermentation. A characteristic sign of a successful fermentation is the disappearance of the gummy surface layers which impart a sticky and glutinous feel and a "waxy" appearance to the shed-cured leaves. After removal of the gums, the leaf surfaces have the velvety touch of a fine blotting paper, sometimes with indications of a definite "grain-like" structure. The structural changes do not remain limited to the leaf surface. With continuation of the sweat process, the texture of the entire leaf is gradually weakened and becomes more tender and finally brittle. This effect, however, reaches larger proportions only in the intensive forms of

fermentation. Aging operations and the milder types of sweat as applied to cigar wrapper and binder leaves are not advanced to a point at which the tensile strength and elasticity of the leaves are seriously impaired.

2. Quantitative Effects

Fermenting tobacco not only shows these qualitative signs, but simultaneously undergoes a number of changes accessible to quantitative measurements. The possibility of expressing these effects numerically does not in itself, however, assure a much better understanding of the fermentation process. Rather, these over-all effects, such as the *loss of dry weight, the generation of heat, the absorption of oxygen and evolution of carbon dioxide, ammonia and other gases, the change of the pH, of hygroscopicity, and of fire-holding capacity* are of such a general nature that their interpretation in terms of specific chemical or physical transformations in the tobacco leaves must remain more or less hypothetical as long as they cannot be supported by additional independent data. From a practical viewpoint, the quantitative changes can serve, just as the qualitative effects discussed above, as indicators of the intensity and speed of the fermentation, with the additional advantage of permitting numerical comparisons where required.

(a) Loss of weight. In Column 9 of Table I, average values are listed for the *losses of dry weight* observed for various types of tobaccos and tobacco fermentations. These losses are not identical with the decrease of *total weights*, which include in addition the changes of the moisture content of the leaves. The more intensive the type of fermentation, the greater are, as a rule, the losses of solids by the leaves (12,64,86,213). As can be seen from Table I (Column 9), as much as 18% of the solids of the tobacco leaves can disappear in an intensive sweat. It would, however, be erroneous to expect that these losses of solids are absolutely reliable indicators of the extent to which the tobacco leaves respond, in the desired fashion, to their treatment. Although the successful sweat of cigar tobacco is usually coupled with weight losses, the reverse is not necessarily true: Under certain conditions a given tobacco sample may show, as a result of its processing, a considerable decrease of solids, without acquiring the quality of a well-fermented specimen. On the other hand, the improvement of flue-cured cigarette tobaccos by aging occurs with

very little, if any, losses of solid leaf components. It may be well to point out here that losses of dry weight indicate merely that, among other reactions, a drastic degradation of certain leaf components takes place, with the formation of volatile products of decomposition or oxidation, as carbon dioxide, water, ammonia, methyl alcohol, and other gases and vapors. Many observations indicate that, along with these drastic chemical reactions, finer, but equally, or even more important, conversions are effected in the leaf tissues without the evolution of volatile products and without corresponding losses of solids.

(b) Generation of Heat. Temperature Increase. The slow combustion of certain leaf components to carbon dioxide and to other volatile products is, as may be expected, an *exothermic process*. Considerable amounts of heat are generated during the types of fermentation that involve measurable losses of solids. Here, the aging process differs again from the other types of tobacco processing; only negligible amounts of heat are generated in the hogsheads containing flue-cured cigarette tobaccos. As to the *magnitude of the caloric effects*, there is no lack of observations regarding the spontaneous *temperature increases* in fermenting tobacco.

Interesting studies on the local distribution of the temperature zones in large bulks of fermenting tobacco were made by K. Hirmke (87), who determined the location of the lines of equal temperature (isotherms) by spotting the interior of the bulks with thermometers. Detailed temperature measurements are also reported in a paper by Whitney, Milton, and Means (243).

The temperature increase is another phenomenon by which the progress of the fermentation may be judged and, to a certain extent, controlled. In many types of sweat procedures, the tobacco is permitted to heat up only to a certain temperature ceiling, usually to 50–55°C.; temperature increases beyond this value are prevented by taking the sweating mass of tobacco apart and by repacking the leaves after they have been cooled and aired (12,31,87,97,98,102,141, 147,187,188).

In repacking, the location of the leaves in the new bulk (or case) is changed in such a manner that leaves which have been inside the sweating mass are now placed at its outside and *vice versa*.

From a scientific viewpoint, the temperature increases are secondary effects, caused by the evolution of a given number of calories in the sweating masses of tobacco. The same quantity of calories pro-

duced by exothermic reactions can lead to very different temperature increases, depending on the time during which the heat is generated and on the losses of heat by convection, radiation, and simultaneous evaporation of moisture.

It is obvious that the losses by convection and radiation will be determined by the size, density, and structure of the units in which the tobacco leaves are packed together as well as by the temperature, humidity, and air movement of the surrounding atmosphere. The internal temperature of large bulks can increase by as much as 50 to 60°C. above the ambient temperature, whereas, in smaller units, such as cases or bales, the increases are usually limited to values of 3 to 6°C. above the room temperature. The heat losses by evaporation of water will depend on the same factors, and further on the amount of initial moisture contained in the tobacco.

Considering all these complicating factors and the fact that the generation of heat is a process that usually extends over many weeks and is often interrupted by "rebulking" or "recasing," it is not astonishing that only meager data are available as to the actual total *number of calories* which are generated by a given amount of tobacco during its fermentation. Some efforts have been made to calculate the total caloric effect from the observed temperature increases in large bulks of sweating tobacco by estimating the simultaneous losses of heat to the surrounding atmosphere, including the losses to the air which diffuses through the bulk, and by taking into account the caloric requirements for the evaporation of moisture from the fermenting tobacco. With the help of numerous assumptions K. Hirmke (87) has thus estimated values of about 215 Cal. and 240 Cal. per kilogram of tobacco, for the total heat produced by the bulk fermentation of two types of Galician tobaccos, the weight loss of which, during their bulk fermentation, amounted to roughly 5%.

(1) *Decrease of the Heat of Combustion.* More reliable information on the total caloric effect in tobacco fermentation can be obtained by determining the *heat of combustion* of a given quantity of tobacco *before* and *after* its fermentation. Together with precise measurements of the loss of solids, these measurements would yield an adequate set of data from which to calculate the loss of "heat content" during fermentation, independent of any estimates based on the temperature effects that have occurred. To the author's knowledge, data of this kind are not available except for two determinations of the heats of combustion of an Oriental air-cured cigarette tobacco,* which have been reported by A. I. Smirnov

* Unfortunately, no data were given in the literature accessible to the author on the weight losses obtained for the fermentation of this specific batch of tobacco.

(202). The heat of combustion of 1 kg. of this tobacco was 4476 Cal. before its fermentation; after fermentation at 35°C., its heat of combustion was found to be 4280 Cal.; after fermentation at 50°C., the heat of combustion was 4339 Cal. Assuming for this type of air-cured tobacco a total loss of dry weight during fermentation of 3%, we derive the total amount of Calories generated during the fermentation by 1 kg. of the tobacco from the expression:

$$4476 - (0.97 \times 4280) = 324 \text{ Cal.} \quad \text{and} \quad 4476 - (0.97 \times 4339) = 267 \text{ Cal.}$$

or an average value of 295 Cal.

It is gratifying that this value, although it was derived by a method completely different from the evaluation procedure used by Hirmke, is nevertheless of the same order of magnitude. However, it appears likely that the values estimated by Hirmke are too low, considering that the more intensive fermentation discussed by him is bound to produce a larger caloric effect than does the relatively mild fermentation investigated by Smirnov. The total heat evolution of 295 Cal. would bring the tobacco up to about 300°C. if all the exothermic reactions within the leaves would occur suddenly in an adiabatic system. Actually, the slowness of the heat-producing reactions and the heat losses due to convection, radiation, and evaporation permit only modest temperature increases, which, however, persist over a long period.

In using Smirnov's data some further semiquantitative estimates can be attempted:

(2) *The Heat of Combustion as a Function of the Leaf Composition.* By considering the average chemical composition of an air-cured Oriental cigarette tobacco of the type for which Smirnov determined the heat of combustion, and by taking into account the specific heats of combustion of the various leaf constituents, we obtain from the literature (2,9,15,17,20,27,70,71,106,141,161,165,173,197,200,201,203,214,229) the values listed in Table III.

With Smirnov's value for the total heat of combustion equal to 4476 Cal. per kilogram, the contribution of the 14.2% of unknown organic leaf components listed in Table III is found to equal about 1055 Cal., or about 7.4 Cal. per gram. This may indicate that the unknown leaf components are more closely related to phenols and resins than to compounds rich in hydroxyl groups whose specific heats of combustion lie below 7.4 Cal. per gram. However, the limited reliability both of the measured heats of combustion and of the heats calculated in Table III makes this deduction a probability rather than a well-founded conclusion. For a more concise and more trustworthy evaluation, it would be necessary to determine for one given type of tobacco, with the highest possible accuracy, its heat of combustion, its loss of weight, and its chemical composition at successive steps of the processing.

(3) *Coordinating the Decrease of Total Heat of Combustion with the Conversions within the leaves.* As to the decrease of the heat of combustion caused by the fermentation, a coordination of this effect with the *chemical changes during fermentation* can be attempted as follows. According to various data in the literature, an Oriental type of air-cured cigarette tobacco loses approximately 3% of its dry weight as a result of its fermentation (165,200,201). Analytically, it shows, after the fermentation, an average loss of 2.0% carbohydrates, 3.5% citric and malic

TABLE III
CALCULATION OF HEAT OF COMBUSTION OF AN ORIENTAL TYPE OF CIGARETTE TOBACCO

Component (1)	Percentage of dry wt., air-cured stage (2)	Heat of combustion of 1 g. of each component, in Cal. (3)	Contributions to total heat of combustion of 1 kg. of tobacco, in Cal. (4)
Ash.....	11.0	0 3	33 ^a
Cellulose and lignin.....	10.5	4 6	483
Pentosans.....	2.0	4 0	80
Pectins.....	9.0	4 0	360
Oils, resins, waxes, fats.....	7.5	9 5	713
Phenols, polyphenols, tannins...	1.8	6.8	122
Citric and malic acids	10 0	2.4	240
Oxalic acid.....	1.0	0.7	7
Other unknown organic acids...	3.5	3.0	105
Proteins.....	5.6	5.6	314
Amino Acids.....	3.5	3.9	137
Ammonia.....	0.4	3.5	14
Nitrates.....	1.0	None	None
Alkaloids.....	1 5	8.9	133
Poly- and monosaccharides.....	17.5	3.9	680
Unknown.....	14.2	Unknown	Unknown
<i>Total</i>	<i>100 0</i>		3421 + un- known amt. of cal. for combustion of 14.2% of unidentified components

^a Mainly heat of reaction: $K_2O + CO_2 \rightarrow K_2CO_3$.

acids, 1% pectins, about 0.2% nicotine, 0.15% ammonia, and small additional decreases of the analytical values for chlorophyll, pentosans, polyphenols, and amino acids (27,106,161,165,200). All these values represent percentages of the dry tobacco weight before fermentation. Added up, the "analytical" decreases yield a value of more than 7% of the tobacco weight against an actual loss of total weight of only 3%. This makes it clear that only a fraction of the "analytically disappearing" leaf components can actually have been lost from the leaf (see page 398). Rather, most of these components have evidently remained in the leaves, but have undergone chemical transformations that deprive them of the properties on which their previous analytical determination was based. For every individual type of tobacco and kind of fermentation the nature of these chemical changes has to be known approximately before they can be evaluated in terms of caloric effects.

Specifically, the following conversions seem to cause the "analytical disappearance" of the leaf components mentioned above in the Oriental-type cigarette tobacco we are discussing:

1. *Carbohydrates*: Complete oxidation to CO₂ and H₂O (respiratory combustion).
2. *Citric and malic acids*: Decarboxylation and dehydrogenation to α -keto acids (citric acid \rightarrow acetone dicarboxylic acid; malic acid \rightarrow pyruvic acid) (59).*
3. *Pectins*: Decarboxylation of the galacturonic acid component, and split-off of methyl alcohol.
4. *Nicotine*: About 30% loss by evaporation and about 70% oxidation (see page 393).
5. *Ammonia*: Loss by evaporation.
6. *Chlorophyll, phenols, pentosans, amino acids*: Partial oxidation.

This chemical interpretation of the analytically observed decreases of various leaf components can now be approximately expressed in terms of the correspond-

TABLE IV
ANALYTICAL CHANGES CAUSED BY FERMENTATION OF AN ORIENTAL TYPE OF CIGARETTE TOBACCO AND THEIR EVALUATION IN TERMS OF CALORIC EFFECTS AND OF CARBON DIOXIDE EVOLUTION

Leaf components	Type of change	"Analytical decrease" in % of dry tobacco wt.	Corresponding actual loss of wt., in % of dry tobacco wt.	Loss of heat of combustion, Cal./kg. tobacco	Evolution of CO ₂ , g./kg. tobacco
Carbohydrates (poly- and monosaccharides)	Total combustion, as in respiration	2.0	2.00	78	35
Citric and malic acids	Decarboxylation and dehydrogenation to keto acids	3.5	0.80	17	8
Pectins	Decarboxylation of galacturonic component, demethoxylation	1.0	0.36	9	2
Nicotine	30% loss as such, 70% oxidized to various products	0.2	0.07	4	—
Ammonia	Loss as such	0.15	0.15	6	—
Chlorophyll, phenols, pentosans, amino acids	Partial oxidation	0.25 (estimate)	—	Small	—
<i>Total</i>		<i>7.1</i>	<i>3.38</i>	<i>114</i>	<i>45</i>

ing losses of weight, in terms of caloric effects, and of the evolution of carbon dioxide, as shown in Table IV.

The calculated loss of weight of 3.4% agrees well enough with the actual average

* See Part I, page 359, concerning the cycle of successively formed products, including citric and malic acids, as well as α -keto acids for the chemical path of carbohydrate oxidation. As to new evidence for the operation of this, or a similar, cycle of oxidative steps in the tobacco leaf, see Vickery *et al.* (169,217).

observed loss of 3.0%, particularly if we consider all the assumptions made in obtaining this value.

(4) *Decrease of Specific Heat of Combustion of Tobacco during Fermentation.* As to the value of 114 cal. just calculated for the decrease of the heat of combustion after fermentation (see Table IV) it must be emphasized that this quantity was evaluated by taking into account *merely the effects which are linked to the physical disappearance (weight loss) of fractions of certain leaf components.* This calculation by-passed the *second cause* for the diminished heat of combustion, namely, the *partial oxidation of leaf components to substances which remain within the leaf tissues* and which yield, on combustion, lower caloric effects than they would have yielded before their partial oxidation.

In other words, this second caloric effect is due to a *lowering of the specific heat of combustion of the organic leaf matter remaining in the fermented tobacco.* By using Smirnov's data (see page 338) for the heats of combustion and by taking into account a weight loss of 3%, we can estimate the amount of caloric degradation of the remaining organic leaf components. For simplicity's sake, we shall use, in this calculation, the average of Smirnov's two "after fermentation" values, namely 4310 Cal./kg. for the heat of combustion of the fermented tobacco. For 1 kg. of tobacco before and after fermentation the balance sheet shown by Table V can then be made up.

TABLE V

HEATS OF COMBUSTION OF ORGANIC MATTER IN AN UNFERMENTED AND IN A FERMENTED SAMPLE OF AN ORIENTAL TYPE OF CIGARETTE TOBACCO THAT LOST 3% OF SOLIDS DURING FERMENTATION

Stage of processing	Ash, g./kg. tobacco	Organic substances, g./kg. tobacco	Heat of combustion, in Cal. found	Specific heat of combustion of 1 g. organic substance, in Cal.
Before fermentation	110	890	4476	5.03
After fermentation	113.3	886.7	4310	4.86

Thus, the over-all heat of combustion of organic substances left in the leaves after fermentation has decreased from 5.03 Cal./g. to 4.86 Cal./g. or by 0.17 Cal./g., as a result of the reactions they underwent during fermentation. Being an "over-all" value, this caloric change is an integral quantity and covers substances that remain completely unchanged both chemically and in a caloric sense, as well as compounds that change considerably with corresponding decreases of their heats of combustion. For the 890 g. of organic substances contained in 1 kg. of dry leaves, the total decrease of heat of combustion due to caloric degradation amounts to $(0.17 \times 890) = 151$ Cal. As pointed out on page 338, the total decrease of the heat of combustion of 1 kg. of unfermented tobacco was found to be equal to 295 Cal. The difference between both values, or $(295 - 151) = 144$ Cal., corresponds, according to this derivation, to the heat of combustion of the compounds, or frag-

ments of compounds, actually lost during the fermentation and which amount to about 3% of the dry weight. Independently (see Table IV), a value of 114 Cal. was calculated for the same quantity by making certain assumptions about the chemical background of the weight lost during fermentation.

(5) *General Conclusions from the Caloric Effects.* The calculations presented in the preceding paragraphs support the main assumptions on which they were based. Particularly, the conclusion appears justified that the total decrease of the caloric value of a given initial weight of tobacco, caused by fermentation, originates from *two main* factors: (a) from the loss of definite amounts of certain organic compounds, or fragments thereof, by evaporation or combustion; and (b) from an over-all decrease of the heat of combustion of the bulk of organic matter in the leaves, due to the caloric degradation of certain constituents caused by partial oxidation and by other exothermic reactions.

In many studies of tobacco fermentation, attention was directed exclusively to the first of these two factors only, *i.e.*, to the fact that certain compounds "disappear" as a result of the fermentation. Far less effort has been devoted to attempts of discovering what happens in a chemical and specific sense to the various substances remaining in the leaf tissues and which, after fermentation, escape the net of conventional analytical tests. There can be no doubt that the search for individual hitherto unknown transformation products and the development of quantitative methods for their determination presents a tougher problem to the tobacco chemist than the relatively simple detection of mere "analytical" losses among the compounds for which accurate or conventional analytical methods are at hand. Both the scientific as well as the practical aims of tobacco chemistry will benefit from a deeper chemical penetration into the sector of unknown, or only vaguely known, transformation products. That such a search may lead to positive results can be concluded from recent progress on the fate of the alkaloids in fermenting tobacco (see Sect. IIIC4g).

(c) **Carbon Dioxide Evolution.** As a side-product of the calculations listed in Table IV, a value was derived for carbon dioxide evolution during the fermentation of an air-cured Oriental-type cigarette tobacco. This value was based on certain assumptions about the chemical nature of the reactions which lead to the observed analytical decreases of carbohydrates, organic acids, and additional leaf components.

Just as for the caloric effects, numerous qualitative observations have been made in regard to the evolution of carbon dioxide during the fermentation of tobacco. The slowness of this process and the difficulty of collecting the gases quantitatively without disturbing the fermentation process make a determination of the total amounts of carbon dioxide almost as difficult as the measurement of the total caloric effects. Thus, only estimates can be derived from the data given in the literature (57, 205).

In a study of Volgunov (202), the daily yields of CO_2 produced by two types of Russian cigarette tobaccos were determined over several weeks. Various measurements were made for varied temperatures of the tobacco and for different humidities of the surrounding atmosphere. For our purpose, among the data reported by Volgunov those for a tobacco temperature of 50°C . and a relative humidity of the storage room of 60% are appropriate because these conditions are closest to those employed in the usual fermentation process of this tobacco type. Under these conditions, the daily output of CO_2 was similar for both tobacco types and amounted to about 620 mg. per day per kilogram of tobacco, or, over a fermentation period of 60 days, to a total CO_2 evolution of about 25 to 37 g. by 1 kg. of tobacco.* This value is of the same order of magnitude as the 45 g. CO_2 /kg. tobacco which we calculated by means of chemical considerations as the total yield of CO_2 during the fermentation of an Oriental cigarette tobacco.

Another report on carbon dioxide generation has been published by Zaporozjanu (248) for the cigarette tobacco variety "Virginia Bright" grown in Rumania. This tobacco corresponds roughly to an air-cured type. Most of Zaporozjanu's measurements were made during shed curing. In curing, the CO_2 evolution amounted to about 212 g./kg. tobacco. If we assume, in first approximation, that this carbon dioxide evolution was exclusively due to the complete combustion of carbohydrates, the corresponding loss of dry weight of the tobacco should amount to about 15%. The actual weight loss was 19 to 20%. This fairly good agreement makes it likely that a similar relationship between the loss of dry weight and the carbon dioxide generation also prevails for the subsequent fermentation of this Rumanian tobacco. The fermentation was carried out after the completion of shed curing, and Zaporozjanu reports an average weight loss during the "aging" of the tobacco of 3.5% of solids. This value would lead to a CO_2 evolution of about 48 g. CO_2 /kg. tobacco, an amount of the same order of magnitude as the values of 37 g./kg. and 45 g./kg. derived above.

Jensen and Parmele (96) measured the total amount of carbon dioxide production over 4 days with small batches of a cigar leaf tobacco kept at conditions simulating those of fermentation. They found an average generation of 2.30 g. CO_2 per 100 g. tobacco, which corresponds roughly to a total CO_2 generation, over the entire phase of fermentation, of 60 to 90 g. CO_2 /kg. tobacco. (For this estimate, we assume a gradual decline of the daily CO_2 generation over the entire period of

* The daily yield of CO_2 remained practically constant over the test period of 32 days in Volgunov's experiments.

fermentation in accordance with the observations of Smirnov, 202.) As is to be expected the total output of carbon dioxide is larger by a factor of two to three for the fermentation of this cigar tobacco than for the aging of an air-cured cigarette tobacco.

Although these results indicate that, for certain tobacco types and methods of fermentation, the disappearance of carbohydrates runs closely parallel to the generation of carbon dioxide, it would be erroneous to expect this parallelism to hold for all kinds of aging and fermentation and for all the phases of these processes. In fact, we shall see that a typical flue-cured tobacco loses, "analytically," considerable amounts of carbohydrates without a corresponding generation of carbon dioxide. On the other hand, there is evidence for the occurrence of reactions in fermented tobacco yielding quantities of carbon dioxide that exceed the amounts which can arise from the simultaneous disappearance of carbohydrates (see page 349).

(d) Uptake of Oxygen. (1) *Respiration.* The slow combustion of carbohydrates and of other leaf components is an aerobic process involving the consumption of considerable amounts of oxygen. This is confirmed by the finding that tobacco leaves, during all the phases of processing including shed curing and fermentation, exert a "respiratory activity" characterized by a continuous slow uptake of oxygen that runs parallel with the generation of carbon dioxide. The difficulty of measuring this oxygen uptake quantitatively throughout the various phases of processing, without disturbing the natural response of the tobacco, has so far prevented the precise determination of the total amounts of oxygen which react with a given quantity of tobacco. Measurements carried out over limited periods seem to indicate that *in toto* the quantities of oxygen (in moles) taken up by the leaf tissues are of the same order of magnitude as the amounts of carbon dioxide (in moles) given off over the same period. Such a balance between the two gases is to be expected for the slow respiratory combustion of carbohydrates for which the molar ratio CO_2/O_2 , or the respiratory quotient, R.Q., should be unity. For the respiratory oxidation of other leaf components such as organic acids (malic or citric), the R.Q. would be equal to 1.33; for the slow combustion of proteins, the R.Q. would lie below unity, close to 0.7.

Detailed studies, however, have revealed that the way in which the oxygen is consumed by tobacco leaves, at least at certain stages of their processing, is *not compatible with the concept that respiratory combustion is the sole effect responsible for oxygen absorption* throughout the entire fermentation. Both in an initial period and in the final stages of the fermentation the consumption of oxygen and the gen-

eration of carbon dioxide proceed in patterns which indicate that, during these phases, chemical conversions other than respiratory oxidation occur in the leaf tissues. The capacity of tobacco leaves to absorb oxygen and to liberate carbon dioxide can easily be determined in "spot checks" on small samples of wetted leaf or on leaf particles in water suspension by using the conventional manometric method of measuring gas exchange in a Barcroft-Warburg or similar apparatus.

As a rule the aqueous medium is buffered, for these checks, to the "natural pH" of the leaves (between 5 and 6).

In the living state, as well as during a major part of the shed curing, the tobacco leaves, if tested in such respiratory checks, show the regular behavior of normal plant tissues: they maintain a slow but continuous oxygen uptake and carbon dioxide evolution with a respiratory quotient between 0.7 and 1.0.

(2) *Autoxidation*. At later stages of curing, however, definite changes seem to occur in the tobacco leaves. Respiration studies carried out with leaf samples at this point reveal a quite different type of gas exchange. Instead of the previous moderate but steady uptake of oxygen coupled with a simultaneous liberation of approximately equimolar amounts of carbon dioxide, the leaves absorb instantaneously relatively large amounts of oxygen. At the same time a mere fraction of the equimolar amount of carbon dioxide is liberated; and the R.Q. is depressed, accordingly, to values as low as 0.2. This high oxygen uptake declines rapidly during the respiration check and drops to one-fifth to one-tenth of its initial value in a few hours. As the carbon dioxide evolution decreases but little over the same period, the low initial R.Q. increases gradually and reaches its normal value of 0.8 to 0.9 after a few hours of an abnormally high but continuously declining oxygen uptake.

The following experimental data (60) may illustrate these effects. Wetted (25% moisture) leaves of Pennsylvania Seedleaf tobacco (U. S. Type No. 41), were fermented after casing and "natural sweat" (see Table I) in gas-tight containers. On admission of fresh portions of air, they showed an initial rapid uptake of approximately 0.4 mg. O₂ or of about 12 micromoles O₂ for 1 g. tobacco dry weight; the simultaneous evolution of carbon dioxide was estimated to be not more than 0.12 mg. or about 2.9 micromoles CO₂ for 1 g. tobacco (R.Q. = 0.24).

Smirnov and Morozenko (204) reported for particles of an unfermented Oriental-type cigarette tobacco, which were suspended in water, an uptake of about

0.2 mg. O₂, or of about 6 micromoles O₂, for 1 g. of the tobacco particles over one hour during which the suspension was shaken continuously. The simultaneously generated amount of carbon dioxide amounted to only 0.065 mg. or to about 1.5 micromoles (R.Q. = 0.25).

In a special study, E. A. H. Roberts (180) investigated the respiratory activity of the leaves of a cigarette tobacco grown in India at various successive stages of the flue-curing process. As long as the leaves had been exposed in the curing barn to temperatures not exceeding about 55°C. samples withdrawn for spot tests, if suspended in buffered water (pH = 5.8) showed a normal respiration and R.Q. between 0.7 and 1.0. However, shortly after the tobacco in the curing barn had been exposed to temperatures above 55°, newly withdrawn leaf samples, if suspended in water and tested in the Barcroft-Warburg apparatus, rapidly took up considerable amounts of oxygen with the simultaneous liberation of only small amounts of carbon dioxide. The R.Q. during the first half hour of these tests was about 0.3, but increased within two hours to the normal value of 0.9 due to the decline of the oxygen absorption. A significant effect occurs simultaneously with this suddenly appearing capacity of the flue-cured leaves to absorb excessive amounts of oxygen. On contact with water, the yellow leaves assume a brown tint and give off a reddish brown substance into the surrounding liquid. According to Roberts, this solution "gives all the reactions for a polyphenol." This observation and the uptake of excessive oxygen without the generation of corresponding quantities of carbon dioxide are interpreted by Roberts as signs for the appearance of easily oxidizable polyphenols in the leaf tissues at this stage of the curing process. This conclusion is also strongly supported by the observation of various Russian authors that the uptake of excessive quantities of oxygen by tobacco suspensions can be further enhanced by the addition of hydroquinone, *i.e.*, a typical diphenol, to the suspensions. That no such action of polyphenols as oxygen acceptors is previously apparent in the intact tobacco leaves and during the first stages of the curing, but requires a prior treatment of the leaves with temperatures above 55°C. followed by their contact with water, is explained by Roberts as follows. Phenomena observed with other plant tissues* indicate that the permeability of the protoplasmic membranes in leaves undergoes a sudden increase between 50–60°C. As a result of this change, the cytoplasm becomes freely permeable to all solutes of the vacuole, and oxidizable substances such as polyphenols will suddenly gain access to areas where they become exposed to the combined action of oxygen and of enzymes of the oxidase type.

That the excessive oxygen uptake by cured tobacco leaves represents an autoxidative process of certain leaf components is also supported by quantitative considerations. The amounts of excess oxygen absorbed by tobacco leaves in gas exchange tests are in reasonable agreement with the quantities of oxygen that can be expected to react with the "polyphenols" and related oxidizable substances con-

* Observations are quoted for *Mimosa pudica pulvinus* and for tea leaves (179, 181,182).

tained in the leaves if the analytically found amounts of these substances are taken into account. For instance, the total excess oxygen absorbed in one test described by Roberts amounted to about 19 micromoles O_2 per gram of the leaf tissue (80% moisture), or to some 100 micromoles O_2 per gram of dry leaf weight. This value corresponds to the oxygen consumption which would have to be attributed to roughly 3 to 6%* (dry weight of tobacco) of quercetin, a typical polyphenol of the flavonol type and a component of rutin, which is a known constituent of tobacco leaves. Analytical determinations by various authors indicate the presence of polyphenols in tobacco leaves of the order of 2%. It must be considered that these analytical values have been obtained by rather crude methods (Sect. IIIC2g) and that the results of these analyses are usually expressed in terms of "glucose," a practice that may easily lead to percentages which are too low by a factor of two. Roberts calculated from manometric measurements carried out, under other conditions than the usual respiration tests (O_2 uptake in an alkaline medium), independent estimates of roughly 4.5% "quercetin" or 9% "rutin" of the dry weight. It is, of course, an oversimplification to express the sum of oxidizable substances in the tobacco leaves in terms of quercetin or rutin. Couch found only up to 0.6% of rutin in cigarette tobacco leaves (35-37). Rather, a considerable amount of the autoxidizable components will probably consist of many different substances. Of these we may mention the flavonols and tannins, as well as compounds belonging to chemically different classes which in common with the polyphenols have the property of being easily oxidized in an aqueous medium and in the presence of the enzymic oxidase system of the leaves without liberating carbon dioxide in this process. Not only the polyphenols and tannins, but also amino acids, ascorbic acid, unsaturated fats, and resins may function as substrates in these autoxidation effects, particularly if the polyphenols act as oxygen transferring agents.

See also page 383, concerning the oxidation of amino acids in the presence of amino acid-quinone complexes as redox catalysts, and the footnote on page 374.

(3) *Mechanism of Autoxidation.* Whatever the specific chemical interpretation of these autoxidations or dehydrogenations may be, it

* Depending on which assumption is made for the stoichiometric relation of oxygen uptake (one or two oxygen atoms) by one molecule of quercetin or rutin.

seems well established that, at the end of the curing process, easily oxidizable constituents of the tobacco leaves have been shifted into positions in which they can participate in chemical conversions that are important for the fermentation process. For their oxygen uptake a minimum content of water in the leaves appears to be indispensable, and it is significant that one of the most critical factors in starting and controlling the more intensive forms of fermentation is the amount of water introduced into the leaf tissues. The oxidation of the "polyphenols" is a significant effect not only *per se*, but also in view of the possibility that these compounds may act as oxygen-transferring agents, and as mediators for the oxidation of other leaf components which, without such mediation, would remain unchanged. Roberts (179-182) expresses the opinion that the phenolic compounds may introduce, via a dynamic change between their hydroquinone and quinone forms, the direct oxidation of hydroxy acids and carbohydrates. Thus, the actions of the autoxidizable compounds are possibly of great importance for the entire fermentation process.

The autoxidation of the "polyphenols" requires: (1) their transport to locations in the leaf tissues where they can contact other reactants; (2) a minimum amount of water; and (3) the presence of enzymes of the oxidase type, or, more generally, of oxidation catalysts in the leaf tissues.

In flue-cured leaves, the first of these demands is apparently satisfied, according to Roberts. However, the second and third conditions are not complied with due to the rapid removal of most of the moisture from the leaves and to the inactivation of the oxidative enzymes by the high final temperatures of the flue-curing process. As a result, the polyphenols are "frozen" in flue-cured leaves without further changes. In air-cured cigarette tobacco, and in cigar leaf tobacco, however, the autoxidation effects can proceed without serious obstacles. (According to Couch (36), rutin is found only in green and in flue-cured, but not in air-cured, tobacco leaves.)

As pointed out previously, the oxidation of polyphenols and of similarly reactive leaf components probably persists in the form of an oxygen-transferring mechanism over an extended period of time after the initial effect of the direct oxygen uptake. Concurrently, a slowly, but gradually increasing fraction of the oxidizable polyphenols and tannins undergoes irreversible oxidations and polymerizations to stable end-products. As a result, during fermentation, the tobacco

leaves slowly lose their capacity for oxygen uptake. In gas exchange tests with leaf samples, Zaporozhanu (247) found, for a shed-cured cigarette tobacco (Virginia Bright), an oxygen uptake of about 0.22 mg. O₂ or 7 micromoles O₂ per gram of dry tobacco weight. After fermentation, in a corresponding test, the leaves were able to take up, per gram, only 0.024 mg. O₂ or 0.77 micromole.

(e) **Decarboxylation.** The preceding evidence proves that properly cured tobacco leaves, with the exception of flue-cured tobacco, possess a transient capacity to absorb oxygen in excess of the simultaneously liberated carbon dioxide at the start of their fermentation. Just the opposite effect appears, as a rule, toward the end of tobacco fermentation, particularly if the fermentation is carried out with large bulks of tobacco. At this stage of the process, the R.Q. passes unity, and reaches values of 1.2 and higher.

At very high humidities of the surrounding air (95% relative humidity) and at simultaneous high temperatures of the tobacco (70°C.), this final preponderance of carbon dioxide evolution can reach values corresponding to a respiratory quotient of 2.5 to 3.0. This demonstrates the final emergence of anaerobic decarboxylations among the conversions within the leaf tissues. Significantly, these decarboxylations are favored toward the end of the fermentation when the capacity of the tobacco for oxygen uptake nears exhaustion. It is obvious that these anaerobic effects will be favored by the lack of oxygen such as develops within large masses of fermenting leaves. Among the various components of the leaves the organic acids are the most likely source of this anaerobic liberation of carbon dioxide (205), particularly those acids which undergo decarboxylations easily, as the uronic acids (galacturonic acid, as a component of the pectins), and the α -keto acids (formed from citric and malic acids—see Sect. IIIC2b, and from amino acids—see Sect. IIIC4e).

It may be mentioned in this connection that Schlösing (187–189) has found for the drastic fermentation of snuff tobaccos that the total content of oxygen and of carbon dioxide in gas samples withdrawn from the interior of the fermenting bulks exceeded 21 volume per cent, *i.e.*, the volume percentage of oxygen in air. In some instances, Schlösing found volume percentages of carbon dioxide plus oxygen as high as 35% for this intensive fermentation. This is another indication of the existence of anaerobic decarboxylations with the autoxidative and combusive processes, at least under very drastic conditions of fermentation.

However, the unraveling of these various types of simultaneous reactions, merely by means of the observed "gas exchange" must remain of a qualitative nature unless our knowledge is complemented by thorough studies of the individual chemical conversions which the various leaf components undergo during fermentation.

(f) **Evolution of Other Gases and Vapors.** The evolution of *ammonia* vapors by fermenting tobacco, particularly by sweating cigar leaf filler tobacco, snuff, or chewing tobaccos, is well known to everybody who has entered the fermentation chambers in which such tobacco types are being processed. We shall see later that the total nitrogen content of "sweating" tobacco decreases usually by amounts between 0.01 and 0.60% of its dry weight, or by 0.25 to 12% of its original nitrogen content, as a result of the fermentation. A considerable part of these losses of total nitrogen must be attributed to a volatilization of nitrogenous compounds which escape from the fermenting leaves into the surrounding air. (As to another cause for nitrogen losses in flue-cured tobacco, see page 407).

An additional source of nitrogen losses is possibly caused by a translocation of nitrogenous compounds, during fermentation, from the leaf blades into the midribs of the leaves. As the midribs are usually removed before the analysis of leaf samples, such a migratory effect would cause a nitrogen loss from the leaf blades without a corresponding evaporation of nitrogenous substances from the bulk of fermenting tobacco. Zaporozjanu (247) claims to have found indications for such a translocation of nitrogenous compounds from the blade into the midrib in the fermentation of a Rumanian cigar tobacco. Analyses of samples before and after fermentation which were made in the author's laboratory have shown that, in Pennsylvania cigar leaf tobacco, the loss of total nitrogen in per cent of its initial amount is practically the same in the leaf blades and in the midribs. This seems to prove that, with this tobacco type, translocation of nitrogen from the blades into the midribs does not occur during the fermentation.

A fraction of the nitrogen lost by evaporation corresponds to volatilized ammonia. An escape of ammonia from the leaves is not necessarily to be expected, even if ammonia and ammonia compounds increase in the tobacco leaves during the fermentation. Rather, it will depend on the pH of the tissues, on the temperature and moisture of the tobacco, and on the humidity and turbulence of the surrounding air, how much, if any, ammonia will be given off by the tobacco.

Experiments (58) which throw some light on the quantities of ammonia lost from fermented cigar leaf tobacco were carried out in the author's laboratory by withdrawing, in a vacuum, the vapors and gases given off by fermenting Pennsylvania Seedleaf tobacco at a certain stage of the resweat process. The condensate consisted mainly of water and amounted to roughly 1 liter per 110 kg. of the dry weight of tobacco. This one liter corresponds to about $\frac{1}{44}$ of the total amount of water lost by this tobacco over the entire duration of its resweat. The aqueous condensate contained about 350 mg. NH_3 and 250 mg. nicotine per liter. If we assume that the relative amounts of water vapor, ammonia, and nicotine that

evaporate during fermentation would remain approximately constant, we derive a value of about 15.4 g. for the ammonia and 11.0 g. for the nicotine which would escape from 110 kg. tobacco during the entire fermentation process. Thus the losses would amount to roughly 0.014% ammonia and to about 0.010% nicotine (of the tobacco dry weight), or to about 0.011% ammonia nitrogen and to about 0.002% nicotine nitrogen. Both these values appear very small when compared with the total loss of nitrogen shown by the same tobacco sample at completion of fermentation—about 0.30%. An explanation of this drastic discrepancy could probably be provided by assuming that the basis of our calculation was wrong. It is very likely that the evolution of ammonia and of nicotine from the tobacco per unit of water evaporated will strongly increase toward the end of fermentation due to the increasing alkalinity of the tissues. More experimental work is needed to clarify this point.

Methyl alcohol has been found to escape in considerable amounts from fermenting tobacco. The quantities evolved during fermentation vary between 0.04 and 0.12% of the dry tobacco weight. It originates from the demethoxylation of pectins. Of other compounds, *essential oils* have been found, in amounts of the same order of magnitude as those of methyl alcohol, among the vapors in fermentation chambers (202). Furthermore, *volatile acids* (formic and acetic) seem to be exhaled, particularly from cigarette tobaccos, and *carbon monoxide* has been determined as a component of the gases in fermentation rooms in amounts equaling about 20% of those of the evaporating methyl alcohol.

That additional organic substances are volatilized from fermenting tobaccos may be suspected from the following consideration. An approximate figure for the loss of *total carbon* during the fermentation of Pennsylvania cigar leaf tobacco can be calculated from carbon determinations of this tobacco made with samples before and after their fermentation by Haley, Longenecker, and Olson (82). In assuming a weight loss for this tobacco of about 8% during fermentation, the total loss of carbon amounts to about 3.5% of the dry weight of the tobacco according to these determinations. If all this carbon were lost in the form of carbon dioxide, this would correspond to an evolution of about 129 g. CO₂/kg. tobacco. This amount is considerably larger than the values we estimated previously for CO₂ generation during the fermentation of an air-cured Oriental-type cigarette tobacco. Although it is possible that the more intensive sweat of cigar leaf tobacco results in the evolution of larger quantities of carbon dioxide than the fermentation of cigarette tobacco (compare the estimated value of 60 to 90 g. CO₂/kg. cigar leaf, page 343), the possibility cannot be excluded that an appreciable part of the loss of 3.5% of carbon is caused by the escape from the fermenting leaves of gases which, besides carbon dioxide, contain a number of volatile organic compounds. So far, only methyl alcohol, essential oils, and organic nitrogenous substances have been identified among these products.

Any discovery of additional volatile products of a specific chemical nature will be valuable for the interpretation of the chemical changes in the leaves proper.

In conclusion of this survey on the gas exchange of fermenting tobacco and on the liberation of volatile substances during the processing, it may be emphasized that all the values quoted can vary over a wide range, depending on the specific type of tobacco and on the kind of fermentation. The available data on oxygen uptake and carbon dioxide generation are not contradictory to our present general concept of the main chemical changes in fermenting leaves. They can serve as relative indicators for the intensity and progress of the fermentation. Unfortunately, the unspecified nature of oxygen uptake and of carbon dioxide generation prevents the drawing of far-reaching conclusions concerning the chemical background of fermentation until additional chemical evidence can be correlated with these data.

(g) Changes of pH. Easily measured but hard to analyze as to causes and significance are the changes in pH that occur as a result of fermentation. Usually, pH is determined on aqueous extracts of the leaves. Measured in this way it probably represents the result of an integration over the pH values which existed at locally different "regions" in the leaf tissues.

Essentially, the pH of aqueous tobacco extracts is controlled by a buffer system consisting of various water-soluble leaf components. Thus, any shift of pH resulting from the fermentation process must have its cause in changes of one or more components of the buffer system. Among the constituents of the buffer system in aqueous tobacco extracts, the following seem to be of particular importance: (1) cations and basic substances— K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , NH_3^+ , pyridine bases including the alkaloids, basic amino acids, unknown organic bases; (2) anions and acidic substances— SO_4^{--} , PO_4^{---} , Cl^- , $(NO_3)^-$, organic acids like citric, malic, oxalic, pectic, uronic, and nicotinic acids, phenols and phenolic acids, and unknown organic acids (possibly including hexonic acid). Of lesser importance for the buffer action are amphoteric electrolytes such as the nonbasic amino acids and amides. Shifts in the relative amounts of these components, or formation of new basic or acidic components will manifest themselves in changes in pH. The demethoxylation of pectin to pectic acid, the oxidative change of carbohydrates to hydroxy or keto acids, the disappearance of basic substances, as of ammonia or alka-

loids, will result in a lowering of *pH*. The decarboxylation of acids, the formation of ammonia from amides, amino acids, and peptides, and the oxidation of phenols to quinones will, on the other hand, result in an increased *pH*. Considering these manifold counteracting possibilities, it is easily understandable that *pH* changes in the leaf tissues will have to be accepted as the final result of an intricate complex of numerous individual chemical changes and that their straightforward interpretation, without a number of additional data, will necessarily remain mere guesswork.

Nevertheless, certain regularities of *pH* changes are unmistakable. The *pH* of green tobacco leaves at harvest time for both cigar and cigarette tobaccos is about the same and lies between the limits of 4.8 to 5.6. As a result of shed curing, the *pH* is shifted, for cigar tobaccos, considerably to the alkaline side, and for air-cured cigarette tobaccos, only moderately: for flue-cured cigarette tobaccos, the *pH* remains practically unchanged. At completion of the curing process, the *pH* of cigar tobacco lies between 5.8 and 6.8, for air-cured cigarette types, between about 5.4 to 5.8, and for flue-cured types, between about 5.0 to 5.4. Fermentation and aging increase the gap still fur-

TABLE VI
CHANGES IN *pH* OF AQUEOUS TOBACCO EXTRACTS CAUSED BY AGING OR FERMENTATION

Tobacco type	<i>pH</i>		Change	Literature
	Before aging	After fermentation		
A. Cigarette				
<i>Flue-cured</i>				
N. Carolina	5.25	4.80	-0.45	(38-41,45)
New Zealand	5.56	5.43	-0.13	(5,16)
<i>Air-cured</i>				
Oriental	5.15	5.00	-0.15	(201)
Hungarian				
2 varieties	5.70	5.42	-0.28	(17,19)
1 variety	5.58	5.75	+0.17	(17,19)
Rumanian				
"Virginia Bright"				
Yellow leaves	—	—	-0.20	(248)
Brown leaves	—	—	+0.50	(248)
B. Cigar				
Wisconsin binder	6.7	7.8	+1.10	(96)
Pennsylvania filler	6.3	7.0	+0.70	(58)
Various cigar leaf types	—	6.4 to 7.3	—	(171)

ther between the "alkaline" cigar leaf types and the "acidic" cigarette types, as can be seen from Table VI.

The pH decreases during aging of flue-cured tobacco and of some of the air-cured varieties. However, some air-cured cigarette tobaccos, particularly the "brownish types," show an increase in pH . Cigar leaf tobaccos, snuff, and chewing tobacco move clearly toward the alkaline side during fermentation. For cigarette tobaccos, the increase of acidity with aging is occasionally used as one of the quality standards of the leaf.

(h) Changes in Water Retention. The somewhat vague term "water-holding capacity," occasionally also referred to as "hygroscopicity" of tobacco, corresponds to the amount of moisture present in the leaves in equilibrium with a certain water content of the surrounding air, at a given temperature. In other words, the water-holding capacity of a given type of tobacco is a function of both the temperature and the partial pressure of the water vapor in the gas phase (relative humidity). No systematic measurements have been reported of a corresponding family of isotherms for any type of tobacco leaf, but one single isotherm for 30°C. has been determined for flue-cured tobacco (45). In most of the studies dealing with water-holding capacity, the moisture of the leaves is measured under arbitrarily chosen conditions for the temperature and the relative humidity of the air. Nevertheless, such "spot determinations" can serve as indicators for the relative changes of water-holding capacity which a given type of tobacco undergoes during its processing, provided all determinations within a given series are made under identical conditions.

In Table VII a few data of the literature are listed to illustrate the decrease in water-holding capacity of a few tobacco types. Such decreases have been observed with almost no exception as a result of aging or fermentation. The magnitude of the effects, expressed in Table VII as "change in % of initial water-holding capacity" depends on the specific conditions under which moisture equilibrium has been determined in every individual case. Therefore, as long as no complete study has been made of several water absorption isotherms for a given tobacco type for its various stages of processing, it has only limited significance.

Chemical as well as physical factors are probably responsible for the decrease in water-holding capacity. Among the chemical causes,

TABLE VII
 CHANGES IN "WATER-HOLDING CAPACITY" (SPECIFIC ABSORPTION OF WATER)
 OF VARIOUS TOBACCO TYPES CAUSED BY AGING OR FERMENTATION

Tobacco type	Conditions under which equilibrium was measured		Equilibrium water content of the tobacco, %		Change in % of initial water-holding capacity	Literature
	Tobacco temp., °C.	Relative humidity of air, %	Before aging or	After fermentation		
A. Cigarette Leaf						
Flue cured.	39	50	9.5	4.0	-55	(45)
Oriental air-cured..	30	80	28.	24.5	-12.5	(200,202,203)
Oriental air-cured..	30	95	70	65.	-7.	(228)
Oriental air-cured..	30	50	15.7	14.8	-6.	(228)
Oriental air-cured..	—	—	23.9	20.5	-15	(228)
B. Cigar Leaf						
	30	80	26.1	21.1	-19.2	(229)
	25	75	30.1	17.5	-42.0	(229)

changes of the hydrophilic colloids in the leaf tissues may play an important role, *e.g.*, a denaturation or a "tanning" of the leaf proteins, and the loss of the swelling capacity of pectins, pentosans, and hemicelluloses which goes hand in hand with the gradual disintegration of these substances into their components.

As to the physical factors, changes of the total leaf surface (referring not to the apparent geometric surface of the leaves, but rather to the surface including all its "submicroscopic roughness") and changes of pore sizes and pore distribution can be suspected of having considerable effects on the water-holding capacity of the leaf. A quantitative approach to these physical effects seems possible considering that, in the field of surface catalysis, very satisfactory methods have been developed for the accurate measurement of the areas and porosity of solid surfaces (46). In a purely qualitative way, significant influences of fermentation on the surface structure of tobacco leaves are indicated by the common experience of the trade that the "feel" and appearance of tobacco leaves changes after fermentation in the sense of a development of "grains" and "pimples" (see also page 334) in the leaf surfaces.

These grains are probably caused by the formation during fermentation of crystalline aggregates consisting of materials such as the oxalates, malates, and citrates of calcium, magnesium, and potassium (94,178).

(i) **Improvement of Burn (Fire-Holding Capacity).** As a rule, fermentation improves the burn of tobacco leaves, *i.e.*, it increases the duration of the glow that spreads from an ignited spot* over adjoining parts of the leaf. The aroma of the smoke, other conditions being equal, is favorably influenced by a good burn (81). A burn below 3 seconds is considered to be unsatisfactory for smoking purposes, whereas burn durations of about 10 seconds and above are excellent from an industrial viewpoint (103). (These figures refer to unfermented tobacco; for fermented leaves the scale ranges from 6 seconds for unsatisfactory burn to 20 and more seconds for excellent burn.) The intermediate values correspond to a scale of improving quality of the burn. The fire-holding capacity of a tobacco leaf depends on a number of factors. In a thorough study in which also the older, mostly qualitative data are listed, Johnson, Ogden, and Attoe (104) have varied these factors systematically and observed their influence on the burn, using many thousands of specimens of Wisconsin cigar binder leaf (U. S. Types 54 and 55).

The following elements, according to these authors, influence the burning properties of leaves: the specific region of the leaf area at which the burning test is made, the prior position of the leaf on the stalk, maturity of the leaf, variety of the tobacco tested, the method and efficiency of curing, the weather during the growing season, the nature of the soil, and the amount and composition of the fertilizer used. Obviously, all these factors influence burning properties by controlling, primarily, the structural properties and chemical composition of the leaves. Concerning the relationship between chemical composition and burn, the favorable action of potassium, especially of organic potassium salts, and the harmful effect of chlorine on the fire-holding capacity have been known for a long time (66). Of the nitrogen compounds, ammonia, alkaloids, amino acids, and other substances containing "reduced nitrogen" counteract the fire-holding capacity, whereas nitrates seem to be neutral, or slight promoters. The effects of other leaf constituents, both inorganic and organic, appear to be minor as long as they are not present in excessive amounts.

Fermentation, on the average, doubles the leaf burn of cigar tobacco, but the response of tobacco of different crops varies in this respect within wide limits. With some leaves, a 12-fold improvement of burn was observed after fermentation whereas, with others, particularly those containing little potash or much chlorine, no improve-

* In systematic tests, the ignition is best achieved by contact of the leaf, at a selected point, with an electrically heated, short loop of wire. For each determination, in view of the biological variation between the single leaves, numerous leaf samples must be checked.

ment was observed. The main reason for the promotion of burn after fermentation seems to be the loss and transformation of some of the water-soluble nitrogenous compounds (58). Possibly, the "casing" of the tobacco* as a preparatory step before its fermentation leads to the removal of some of the chlorides contained in the leaf tissues.

III. Chemical Changes in Tobacco Leaves Caused by Fermentation and by Aging

A. ANALYTICAL METHODS

The analytical methods employed (27) in chemical studies of tobacco fermentation are mostly the same as those used for the analysis of green and cured tobacco leaves. Though some of these analytical methods permit the precise identification and determination of specific chemical compounds contained in the leaves, a number of other substances or classes of substances contained in tobacco leaves are merely estimated for presence and amount by means of conventional methods that often lack the desirable specificity and accuracy. This applies, for instance, to the usual analytical procedures for determination of pentosans, hemicelluloses, pectins, polyphenols and tannins, resins, and waxes, and for additional groups of leaf constituents the individual composition of which are only partly explored.

The use of such cursory methods offers the advantage of permitting fast comparative surveys on large numbers of samples. On the other hand, the chemical information obtained by these procedures is necessarily of an approximate nature only. It is important *not* to overestimate the significance of analytical data of this kind, particularly if they are used for interpreting the conversions in the leaf tissues.

It is to be expected that new analytical methods will be applied to an increasing extent to the problems of tobacco chemistry. In addition to extraction methods and to specific organic identification reactions, these new methods will, in all probability, include the ample use of spectroscopic and specialized chromatographic procedures.

For any conclusions concerning the chemical reactions in the tobacco leaf during fermentation, it is furthermore indispensable to take into account the total losses of the dry weight† the leaves suffer

* Dipping the leaves in water to introduce the desired amount of moisture (see Sect. III B1b2).

† As to methods of determining the weight losses, see page 362.

between the various stages at which samples are withdrawn for analysis. By taking into account these losses of solids, the quantities of various leaf components, as found analytically at later stages of the fermentation, can all be expressed in percentages based on the same unit, namely, on the original dry weight of the tobacco sample. This permits recognizing the actual changes of these leaf constituents during the course of the fermentation. From a practical viewpoint, the actual percentage compositions at every specific stage of processing are of course equally important.

B. THE SWEAT OF CIGAR LEAF TOBACCOS

So far, the majority of chemical investigations of tobacco fermentation have been centered around *cigar leaf types*. Two factors have contributed to this. First, the large-scale processing of leaves for the manufacture of cigars, chewing tobacco, and snuff dates back over more than a hundred years, whereas the processing of leaves for cigarettes in quantities comparable to the enormous amounts used today did not start earlier than about 1915. Second, fermentation, as applied to cigar tobaccos, is a critical operation of great if not decisive importance for the end-product, while the aging of air-cured and particularly of flue-cured cigarette tobacco is a less complicated, usually well-reproducible process. Its control presents only minor problems and its scientific clarification appears less urgent from a practical viewpoint than that of the fermentation of cigar leaf tobacco.

Techniques of Cigar Leaf Fermentation

(a) **Bulk sweat (60,68).** Many types of cigar leaf are still fermented by means of the oldest traditional method of "bulk sweat." Typical for this operation are the large piles or bulks in which the leaves are assembled and in which they begin to ferment or to "sweat" as soon as the ambient, natural temperature and moisture conditions are favorable. This happens usually in the first months of spring. For the traditional bulk sweat, the only moisture added to the leaves is a superficial "wetting" with a water spray.

With the onset of fermentation, the temperature rises within the bulks, and concentric regions of decreasing temperatures develop quite rapidly within the masses of the closely packed leaves, with a "hot center" in the very middle (87). As soon as an average temperature of 55 to 58°C. has been reached, the bulks are taken apart and rebuilt, often in a changed form and size.

The bulk sweat has been modified and subdivided for the processing of individual types of cigar leaf. *Wrapper leaves*, such as Sumatra tobacco and American wrapper types go through a controlled sweat in bulks or piles during certain phases of their fermentation. Cuban cigar tobaccos, too, are subjected to a series of bulk sweats in the course of their processing.

For many *filler types* of cigar tobaccos, bulk sweat has gradually been replaced by the "case sweat," which is more adaptable to the large individual variations characteristic of these types of tobacco. In external appearance, as well as in chemical composition, a typical filler type such as Pennsylvania Seedleaf tobacco varies drastically from crop to crop and even within every single crop. A bulk sweat of such highly ununiform leaves leads mostly to uneven results, due to the different extent to which the leaves respond to standard conditions imposed on them. In addition, the rapid and locally different temperature rise in large bulks, the exclusion of air from the central portions of the large units, and the slow escape of water vapor, carbon dioxide, and other gases from the internal parts of large bulks—all prevent a satisfactory control of the fermentation and the production of a uniformly and thoroughly sweated end-product with these tobacco types. This is particularly true for tobacco which, because of specific conditions during its growth and shed curing, shows a high "sweat resistance."

(b) **Case Sweat.** In the case sweat, wooden cases (dimensions given in Table II) are used, each containing roughly 300 pounds of tobacco leaves. The leaves, sorted for uniform size and quality, are bundled in "hands" of about twenty and packed under pressure in orderly rows, layer by layer, into the cases. The construction of the cases permits a moderate and rather uniform air circulation through the layers of tobacco.

(1) *Natural Sweat.* The tobacco packed in these cases is subjected, for at least one year, to a first phase of fermentation—the "natural sweat." Assembled in large blocks, the cases are exposed in warehouses to the heat and humidity of at least one summer, and to the freezing temperatures of at least one winter. The access of air to the pressure-packed leaves and the escape of carbon dioxide and water vapor from them are of course much slower than they were for the free hanging leaves in the previous phase of shed curing. However, a gradual gas exchange takes place. Being a poor heat conductor, the pressed tobacco, during the first stages of the natural sweat, assumes temperatures slightly above those of the warehouse. This heat evolution, and dry weight losses of 5 to 10% during the natural sweat, prove the occurrence of exothermic oxidative reactions in the leaf tissues during this phase. It is obvious that the temperature, ventilation, and gas diffusion are more uniform in the cases than in the large masses of tobacco as used for the bulk sweat.

Only a few details are known about the chemical effects of the natural sweat. They will be discussed in the following section in common with the conversions observed for the following phase of the "resweat." Various observations point

to a gradual breakdown of the cell membranes within the leaves during the natural sweat. Such cell wall ruptures are probably caused by the conversions of proteins, pectins, and hemicelluloses, and are favored by the alternating swelling, shrinking, and freezing of the leaf tissues effected by the seasonal weather conditions. It is likely that the rupture or increased permeability of the cell walls represents an essential preparatory step for the mutual contact and reaction between leaf components which previously were separated in the leaf tissues from one another by the cell membranes. In this respect, the observations of Roberts (180) (Sect. IIB2d2) on the appearance of polyphenols in a certain phase of the flue-curing process of cigarette tobacco are significant. A similar process seems to take place during the natural sweat of cigar leaves, only at a slower and more continuous rate than the sudden breakdown caused by the high temperatures of the flue-curing process.

(2) *Resweal.* At the end of the natural sweat, an average specimen of cigar filler tobacco is still unfit to serve as smoking tobacco. The tobacco must be subjected to an additional treatment, called "resweat" or "fermentation."

To start the resweat, the leaves are submerged in large tubs filled with water ("casing" operation) so that they absorb definite amounts of moisture. They are then repacked under pressure into the cases and stored in "heat rooms" at about 45°C. and 60% relative humidity. This storage is periodically interrupted by repacking and airing of the leaves—the so-called "shaking"—whenever the spontaneous heat evolution of the tobacco has reached its peak.

The durations of the heat periods between the shakes are gradually prolonged; they range from about 3 to 5 days for the "first heat" to 1 or 2 months for the "eighth heat." Easily fermenting tobacco requires only one or two of these heats, and one or two corresponding shakes, whereas a very tough (*i.e.*, sweat resisting tobacco) has to undergo up to ten heats and shakes during its resweat.

In this phase of processing, large differences become apparent between the tobaccos of different crops. Tobacco that grew in a wet season responds, as a rule, quite easily by heating up spontaneously and by readily showing the characteristic external signs of fermenting, whereas the reverse is true for a dry-weather crop. Moreover, the sweat resistance varies very considerably within any single crop. This situation is aggravated by the fact that, for a successful resweat, very definite amounts of water are required by the leaves, depending on their individual sweat resistance. Both smaller and larger amounts than this critical quantity lead to unsatisfactory results. The same is true for the number and duration of the successive heat periods and shakes to be applied. Thus, instead of a standardized over-all method, *every single case of tobacco has to be handled individually* to obtain the best possible results. It is characteristic for this situation that the percentage of water required for the start of the resweat can vary within the limits of 6 to 55% of the tobacco weight, and the duration of the entire resweat process from a few weeks to more than one year. These complicating variations originate mainly from the fact that the weather conditions of the growing and curing seasons produce leaves of widely different chemical composition.

(3) *Finishing.* At the end of a successful resweat, the texture and odor of the tobacco have changed in the desirable direction. The leaves have given off all the water that had been added at the start of the resweat (often even more than

this amount, because additional "reaction water" is lost by the leaves), and are now in a rather dry state.

From this point on, the tobacco goes through a last "finishing" phase of prolonged storage under mild temperature and moisture conditions. During the previous processing, apparently all those conversions within the leaf tissues have been accomplished which involve the chemical change of significant amounts of any leaf components.

Some slow and finely differentiated reactions seem still to persist throughout the finishing period, resulting in a final touch of improvement of the smoking qualities. In character, the phase of finishing with these comparatively small but highly specific chemical effects resembles somewhat the aging process of flue-cured tobaccos. It is conceivable that, during this phase, small amounts of leaf components and particularly of the aroma compounds, such as the essential oils and resins, undergo some intricate changes (for instance, esterification and rearrangement). No special chemical investigations have been made of the finishing process. It can be expected that such an investigation would encounter similar difficulties as are known for the investigations on the aging of wine and related processes in which minute amounts of aroma carriers undergo highly specific and chemically complicated conversions.

Most of the chemical conversions within the leaves continue throughout the entire duration of the fermentation process, whether it consists of a series of bulk sweats or of a succession of natural sweat and resweat. However, a few special types of reaction, such as the transformation of the alkaloids, require particularly drastic conditions. These conversions are not set in motion to any conspicuous extent until the tobacco enters the vigorous phase of resweat. Wherever such preferential appearances of certain reactions in a given stage of the fermentation have been observed, it will be mentioned in the following survey. The remaining conversions will be discussed as over-all effects.

The following report on the chemical changes in cigar tobacco leaves caused by fermentation does not include a detailed description of the composition of the leaves prior to fermentation. Such a description was given in Part I on pages 324-361.

C. ANALYTICAL RESULTS

1. *Loss of Weight*

(a) **Combustion of Organic Matter.** Losses of solids in the bulk sweat total some 20%. For case-sweated tobacco they are about equally divided between the natural sweat and the resweat, and amount to some 8 to 10% for each phase. Most of this loss must be

ascribed to the "natural fuel substances" of the leaf tissues, *viz.*, the carbohydrates, organic acids, and other compounds that fed the respiration of the living plant. Thus, a large part of the weight losses of the leaves is caused by transformation of predominantly non-nitrogenous constituents into volatile products by either decomposition or oxidation.

(b) Losses of Inorganic Matter. A minor fraction of the weight loss is caused by disappearance of inorganic (ash) constituents from the leaves. These inorganic losses appear to be paradoxical at first glance because any volatilization of ash constituents is extremely unlikely. At closer inspection (60) the phenomenon finds its explanation in the fact that the gummy surface layers of the leaves disintegrate in the course of fermentation, particularly during resweat.

The sticky substances covering the leaf surfaces (pectins, pentosans, resins, some nitrogenous substances, etc.) are partly dissolved or emulsified in the "casing water," at the start of the resweat, and partly become increasingly brittle and are shaken off the leaves mechanically during the handling operations. Finally, a last part of the surface gums may disappear due to their oxidative transformation into volatile products. Easily detectable quantities of the insoluble inorganic substances which were embedded in the surface layers are removed with these layers. For Pennsylvania Seedleaf cigar tobacco, the following average losses of ash components during the resweat were determined by us, in per cent of dry tobacco weight, before the resweat: Fe_2O_3 , 0.007%; P_2O_5 , 0.015%; SiO_2 , 0.32%. The calcium, potassium, magnesium, and manganese contained in the leaves show no such losses within the limits of analytical errors. (There are some indications for very small losses of calcium and potassium; however, the percentage of these two components in the leaves are so high that these losses are negligible in comparison.) The fact that the amounts of the last four constituents remain practically unchanged while the leaves simultaneously lose an appreciable amount of dry weight leads to the fermented leaves containing higher percentages of calcium, potassium, magnesium, and manganese than the unfermented leaves. Within the limits of error, the percentage increase of every one of these constituents coincides with the percentages by which the total dry weight of the tobacco drops during fermentation.

This effect of an "apparent increase" of certain inorganic leaf components is often used as the basis of an indirect method of determining the actual losses of solids. Particularly, calcium determinations are appropriate for this purpose. It is advisable, however, to confirm the results of this indirect evaluation of the total weight losses by direct checks, based on weighings and simultaneous moisture determinations of the tobacco before and after fermentation (60).

About 1.3% of the total solids are removed from the leaves with the disintegrating surface gums and of this amount about one-fourth consists of inorganic solids. From a quantitative point of view this effect is rather small. However, its exist-

ence should not be overlooked. One of its consequences is that the use of the analytical values found for iron or phosphorus in tobacco leaves before and after fermentation would yield completely erroneous total weight losses of the leaves.

2. Changes of Non-nitrogenous Leaf Components

(a) **Carbohydrates.** In all the analytical studies in which the *carbohydrates* of cigar leaves were determined before and after fermentation, it was found that these substances disappear to a large extent. The most extensive study of this particular field was carried out by Ward (232), who found that, in a Canadian cigar tobacco, the total carbohydrates decreased from an average of 2.14% to an average of 0.75% as a result of fermentation. Specifically, the amounts before fermentation (B.F.) compare with the amounts after fermentation (A.F.) as follows: *reducing sugars* (dextrose and levulose)—B.F. 1.00%, A.F. 0.16%; *total sugars* (reducing sugars plus sucrose)—B.F. 1.01%, A.F. 0.19%; *dextrin*—B.F. 0.74%, A.F. 0.55%; and *starch*—B.F. 0.39%, A.F. 0.01%. Thus the carbohydrates practically vanish from these tobacco types, with the exception of small amounts of the more resistant dextrin. Behrens (12) found, in a study published in 1894, that all the reducing sugars which amounted to 1.26% B.F. had disappeared at the end of the fermentation. With Pennsylvania Seedleaf tobacco (1936 crop) a drop from 1.8% B.F. to 0.60% A.F. was established in the author's laboratory by averaging the analytical values found for thirty leaf samples. Qualitatively, a large decrease of soluble carbohydrates in fermented tobacco was also found by Müller-Thurgau (145).

According to Jenkins (94) and Kraybill (124), the "starch" and "reducing substances" change but little, or even increase slightly, during fermentation of cigar leaf tobacco. However, these two authors, in their analytical procedures for carbohydrate determination, have apparently omitted removing interfering substances such as phenols, ascorbic acid, etc. before measuring the "reducing capacity" of their tobacco extracts.

The disappearance of carbohydrates is obviously due to their oxidation along a pathway resembling respiration in the living leaf. This oxidation causes a corresponding generation of heat and carbon dioxide. As to the latter, the quantities of carbon dioxide that can originate from oxidation of the relatively small amounts of carbohydrates present in the cigar tobacco types prior to fermentation correspond to not more than about 20 g. CO₂/kg. tobacco. The value

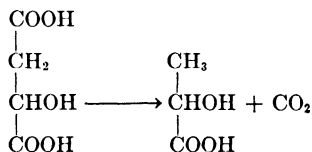
is too small to account for the total amount of carbon dioxide given off by 1 kg. of fermenting cigar tobacco, which can be estimated to be some 60 to 90 g. (see Sect. IIB2c).

(b) **Organic Acids.** It is therefore obvious that other sources in addition to the carbohydrates contribute to the total carbon dioxide generation. Chemical considerations make it likely that *organic acids*, such as citric and malic acid, as well as the *pectins*, and, possibly to a minor extent, *pentosans (hemicelluloses)* participate in the generation of carbon dioxide.

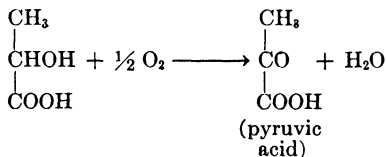
The inference that citric and malic acid contribute considerably to this effect is supported by the following considerations. During fermentation of cigar leaf tobaccos, the *total organic acids** decreased by considerable amounts. Behrens reports a drop of nonvolatile acids from 14.0 to 11.7%. Experiments carried out in this laboratory with thirty samples of Pennsylvania Seedleaf tobacco showed an average decrease of *total ether-soluble organic acids** from 16.8% B.F. to 13.0% A.F., corresponding to the disappearance of 20% of the amounts present in the leaves at the start of the fermentation. Specifically, citric acid dropped from 5.3 to 4.3%. These analytical decreases of organic acids correspond to losses between 2 to 4% of the dry tobacco weight. The "organic acidity" expressed in milliequivalents of organic acids* in 1 kg. of dry tobacco weight drops by about 600 milliequivalents.

Various types of a stepwise decomposition and oxidation of the organic acids can cause this effect. Taking, as an example, malic acid, the following processes are conceivable among other possibilities:

(1) Mere decarboxylation:



(2) Formation of a keto acid by dehydrogenation:



* This term has been widely used in the literature for the fraction of organic acids that are soluble in ethyl ether and can be extracted with this solvent from acidified tobacco samples. Pectic acid and glucuronic and hexonic acids are not included in this class.

(3) Complete oxidation of pyruvic acid (formed in process 2) by $\frac{5}{2}$ O₂ to 3 moles CO₂ + 2 moles H₂O (see Part I, pages 359 and 361).

26 g. CO₂ would be generated by 1 kg. tobacco which loses 600 milliequivalents of acid if a process of type 1 were the one and only cause for the analytical disappearance of the organic acids. This is quite unlikely. The amounts of carbon dioxide arising from the chemical conversions of the organic acids in fermenting cigar tobacco probably exceed the quantity of 26 g. and may be closer to about 50 g./kg. tobacco. Furthermore, since the exhaustive oxidation of the carbohydrates to carbon dioxide and water proceeds, in all probability, over organic hydroxy acids as intermediates, it would be illogical to postulate that the acids proper should merely be decarboxylated without any further attack on their α -carboxylation products (33). In the case of a complete oxidation of the disappearing acids—total effect of reactions 1, 2, and 3—the amounts of carbon dioxide evolved for 600 milliequivalents of lost acid would be about 52 g./kg. tobacco. This value is in better agreement with the estimated quantities of carbon dioxide generated by fermenting cigar leaf tobacco in addition to the amounts arising from the oxidation of the carbohydrates. Thus, it appears likely that a considerable fraction of the analytically disappearing organic acids is completely degraded to carbon dioxide and water. The elimination of a considerable fraction of the citric and malic acids from the leaf tissues is obviously one of the main factors responsible for the shift in pH to the alkaline side in this type of fermentation.

Sinclair and Eny (199) have shown that the pH of lemon juice is controlled mainly by its content of citric acid and that over a wide range this pH is increased by about one unit for every 20% of acid neutralized. This relationship agrees with the observation made for tobacco extracts that the loss of roughly 20% organic acids, caused by the fermentation, results in a shift in pH by 0.7 to 1.1 units (see Table VI) toward the alkaline side.

Although these considerations imply that most of the analytically disappearing organic acids of the citric-malic types are converted completely into carbon dioxide and water, this does not exclude the possibility that minor fractions of these acids, or of their transformation products, undergo other types of conversions. In a previous section (IIB2), we mentioned observations that indicate the temporary predominance of anaerobic decarboxylations (type 1, page 364) which occur toward the end of the fermentation, particularly in bulk fer-

mentation. Whether this anaerobic evolution of carbon dioxide in a certain phase of the process is caused by the direct liberation of CO_2 from citric or malic acid, whether it is derived from intermediates such as keto acids, or whether pectic acid (see next paragraph) participates in this effect will have to be decided by special investigations.

To a small extent, lower molecular acids appear as fermentation products (65,196). How these acids are formed has not been clarified in detail, but it seems plausible that they are side-products of the oxidation of carbohydrates or of higher molecular organic acids, or are products arising from the oxidative deamination of amino acids. Behrens (12,13) found an increase of volatile organic acids from 0.13% B.F. to 0.28% A.F. in fermented cigar leaf. Shmuk and Kashirin (197) report an increase of formic acid from 0.39% B.F. to 0.65% A.F. It would not be surprising if still more volatile acids were found among the products of fermentation. Recently (186), valeric acid, as well as methyl-3-valeric acid was identified in fermented leaves. The latter acids are probably produced from proteins or amino acids (isoleucine) rather than from non-nitrogenous precursors.

Another product that possibly originates from the oxidation of organic acids like citric and malic acids is oxalic acid.

In *living* tobacco leaves, the formation of oxalic acid is apparently independent of the metabolism of citric, malic, and other hydroxy acids (217).

The amount of oxalic acid in the leaves is usually increased after fermentation. For instance, in a study of Pennsylvania tobacco made in the author's laboratory, the percentages of this compound were found to be 3.0% B.F. and 3.4% A.F.

(c) Pectins, Pentosans, and Hemicelluloses. (1) *Pectins*. The oxidation of carbohydrates and of organic acids in tobacco leaves is by no means exclusively limited to the fermentation process. Rather, they are continuations of processes that occur on a conspicuous scale in the living as well as in the curing leaves. A specific influence of the fermentation process, however, is apparent on the hemicellulose type of substances of the tobacco leaves which are components of the cell membranes and cell walls. These compounds, remaining practically unchanged in the living leaf, and being but slightly affected in the curing phase, show signs of profound chemical alterations when the leaves are subjected to the fermentation.

This specific response is clearly shown by the *pectins*, which are

present in considerable amounts in cigar tobacco leaves (2,7,99,122, 149,152,153,161,189,202). The complex structure of the pectins (see Part I, pages 327-328), which comprise as their main component partly methoxylated polygalacturonic acids* in combination with acetic acid, arabinose, and galactose, makes them susceptible to manifold steps of decomposition. Among their destructive changes, the cleavage of some of the methoxy groups with the liberation of methyl alcohol and the severance of carbon dioxide from the galacturonic or polygalacturonic acid residues can easily be recognized analytically. Both these decomposition effects of the tobacco pectins have been studied in quite some detail. The amounts of pectins in cured cigar tobacco, according to various authors, range between 8 and 18%. (This range not only represents the true variations of pectins but also reflects the differences of analytical methods for the determination of pectins.) For the methyl alcohol content of these pectins of the harvested leaf, values between 4.5 and 5.5% have been reported. (Kertész (109) has listed the methyl alcohol content of various plant pectins: of the sugar beet, flax stalk, and orange they vary between 4.1 and 5.5%, whereas the pectins of other plants contain as much CH_3OH as 11.6%.)

Only a small proportion of the total methyl alcohol of the pectins is split off during shed curing. The smallness of this yield is in contrast to the rapid and quantitative demethoxylation of the pectins which occurs when fresh tobacco leaves, after maceration, are subjected to an *autolysis*. Neuberg and Kobel (149-151), who studied these reactions extensively, explain the higher stability of the tobacco pectins in the curing process compared with autolysis by the low water content of the leaves and their fast desiccation in the curing phase. Another possible cause is a local separation of the pectins from the pectin-splitting enzymes (pectase and pectinase) in the intact leaf and a very slow removal of the barriers between the pectins and the pectin-splitting enzymes in the curing process. In the macerated leaf tissues subjected to autolysis, almost immediate contact between enzymes and substrates can be expected. This interpretation is similar to that given by Roberts for the "polyphenolic effect" (see Sect. IIB2d2).

According to Neuberg and Kobel, the loss of methyl alcohol during the *curing* of cigar tobacco amounts to about 0.1% of the dry weight of tobacco or to about 12% of the total methoxyl groups of the pectins in these leaves.

* The earlier concept of a tetragalacturonic acid as a "building unit" of pectic acid appears unjustified according to more recent work (93). There are indications that at least 30 molecules of galacturonic acid constitute the basic unit of the pectins.

About 16% of pectins was contained in the leaves investigated by Neuberger and Kobel. These pectins contain about 5% methoxyl groups equal to 0.8% of the dry tobacco weight.

However, during the *fermentation* of the same leaves, the loss of methyl alcohol, expressed in percentages of the initial total methoxyl groups of the pectins in the leaves, amounts to as much as 85% for cigar leaves and to 50% for cigarette leaves. These findings of Neuberger and co-workers show clearly that the pectins are demethoxylated but little in the shed-curing process,* whereas their decomposition is greatly favored under the specific conditions of the fermentation. It is further shown that the sweat of cigar tobacco carries the breakdown of these polysaccharides to a more advanced stage than does the aging process of cigarette tobacco.

A further step of the pectin decomposition is the decarboxylation of the polygalacturonic acid or of the galacturonic acid remaining as the residue of the demethoxylation. For cigarette tobacco leaves, Andreadis (2) found the total carboxyl groups of the pectic acid to equal about 1.80% of the dry tobacco weight. After fermentation, this value was decreased to about 1.63%. Since undecomposed pectic acid contains roughly 22% of its weight in form of carboxyl groups (109), the figures reported by Andreadis indicate that about 8.1% of pectic acid, or about 11.4% of pectins (including acetic acid, arabinose, and galactose), was contained in the tobacco leaves studied by this author before their fermentation, and that 9% of the pectic acid-carboxyl groups was set free during fermentation in the form of corresponding amounts of carbon dioxide.

As to its absolute quantity, the carbon dioxide derived from this decomposition process amounts to only some 1.7 g. CO₂/kg. dry weight of tobacco, a value that is small compared with the total amounts of carbon dioxide originating from the oxidation of carbohydrates and of other compounds. Nevertheless, it is interesting to point to this decarboxylation as to one of the more specific conversions occurring in the fermenting leaves.

(2) *Pentoses and Pentosans.* In conjunction with the pectins and with other substances of the hemicellulose type, the pentosans form the membranous material and particularly the cell walls of the leaf

* Possibly, less conspicuous changes of the pectins, such as depolymerizations, occur at an earlier stage than the analytically easily discovered liberation of methyl alcohol (93).

tissues. The content of pentosans and pentoses in tobacco leaves amounts to an average of 3.5% of the dry tobacco weight.

On hydrolysis, the pentosans decompose into pentoses. Analytical determinations of the pentose content of tobacco leaves, before and after fermentation show considerable variations insofar as, with some samples, increases of the pentoses have been observed (14), whereas others show a decrease of pentoses after fermentation. Such an irregular behavior is to be expected for substances that appear as intermediates of reaction in the leaves. In every individual sample, the amounts found after fermentation of such compounds will depend on the relative rates at which they are formed and at which they are removed by subsequent reactions. In the field of the normal polysaccharides, similar conditions prevail for the hexose sugars derived by the hydrolysis of starch but subsequently oxidized to acids and carbon dioxide. In the same sense, ammonia behaves like an intermediate, as will be discussed in Section IIIC4i.

Increases of the pentoses found after fermentation can be explained by the two processes of pentosan hydrolysis and by decarboxylation of galacturonic acid, which latter reaction yields arabinose. Once they are formed, the pentoses seem to be subject to oxidations, just as are the hexoses. This explains the cases in which a decrease has been observed after fermentation. In the author's laboratory, thirty samples of Pennsylvania Seedleaf tobacco yielded, on analysis, an average of 3.4% B.F. and of 3.0% A.F. of pentoses. Possibly, the disappearance of the pentoses may also involve a dehydration to furfuraldehyde, as a first step. Small amounts of furfuraldehyde have been found in fermented tobacco leaves by Jetta (99) and by Boekhout and de Vries (21).

(d) Cellulose and Lignin. Small changes, if any, appear to occur in the cellulose and lignin content of the leaves in the course of fermentation. There is an obvious parallelism between the declining chemical reactivity and the diminishing chemical response to fermentation in the series: sugars, starch, pectins, pentosans, cellulose, and lignin. Just as with the main inorganic compounds, the percentages of cellulose and lignin found in fermented leaves are relatively higher than in the unfermented leaves, due to the loss of total dry tobacco weight. The "apparent percentage increase" of these structural leaf components, on the average, is numerically equal to the percentage loss of leaf weight, indicating that their amounts have re-

mained practically constant throughout the fermentation process. This result, derived from the usual analytical determinations of "crude fiber," does not exclude the possibility that some finer chemical changes are occurring. Andreadis (2) found an increased methoxyl content of lignin in tobacco leaves after fermentation. It is furthermore conceivable that the cellulose is, at least partially, oxidized to oxycellulose, an effect that may explain the greatly increased brittleness of thoroughly sweated tobacco leaves. If occurring to any extent, this transition would probably contribute to the improved smoking properties of the fermented leaves.

Oxycellulose, as, *e.g.*, prepared by a method developed by Kenyon and co-workers (108), develops, on ignition, less irritating gases and vapors than does cellulose.

(e) Essential Oils, Resins, and Waxes. A particularly obscure sector of leaf constituents is that of the essential oils, resins, and waxes. Because of their complex composition, which includes a vast number of varied substances (see Part I, pages 330-333), this fraction of tobacco components has so far withstood repeated efforts (14,18,27, 59,68,112,118,158,172,173,185,194,202,214,220) to identify the bulk of its constituents. In addition, a special difficulty is presented by the high reactivity of the resins, which manifests itself in their tendency to autoxidize, to condense, and to polymerize, not only in the leaves, but also during the chemical operations devised for their separation and analytical investigation. Usually, analysis of the resins has been attempted by their separation into various fractions, using successive extractions with different organic solvents. These initial steps are followed by investigations of the diverse fractions.

Several authors have concluded from their results, and particularly from the behavior of the substances contained in the various fractions toward aqueous acids and alkalis, that the main components of the resin complex are resin acids, resin alcohols, resinous phenols, resin ethers, and highly polymerized "resenes," and "resinols." Those of these compounds characterized by high volatility are listed as "essential oils." In addition, waxes are found as components of the resin complex. How unsettled the questions are concerning the nature of the resinous leaf components is demonstrated by the fact that Pyriki (172), in a recent paper, concludes that there is no chemical evidence for the existence of resin alcohols and resin phenols as was claimed by most of the previous investigators. According to Pyriki, the main components of the resins are resin acids (some 57 to 60% of the total resins), and some ether-soluble resenes (some 32%), minor fractions

consisting of substances insoluble in ethyl ether (resinols), and of essential oils (some 3% of the total resins, or 0.2% of the dry leaf weight).

One of the few points on which most of the investigators agree is the amounts of "waxes" (some 5% of the total resins, or about 0.45% of the dry leaf weight) in the resin complex. Certain of these waxes have been identified in some earlier work as paraffins, of which the individual compounds heptacosane ($C_{27}H_{56}$) and hexatricontane ($C_{31}H_{64}$) have been isolated and identified (212).

As to the fate of the essential oils, resins, and waxes in the processing of the leaves, it has been found generally that the sum of these substances decreases substantially during fermentation (12,14,58,94,112, 113,220). An average value of the total decrease of the resins during fermentation, as obtained from observations of various investigators, shows a drop of from about 7.8% B.F. to about 5.0% A.F. or by about 36% of the initial amounts. In discussing this analytical result, it is well to remember that the estimate of the total resins present in a given tobacco sample is, as a rule, based exclusively on solubility determinations. In other words a decrease in the tobacco leaves of the substances soluble in petroleum ether (or in ethyl ether, or in benzene) is identified with a corresponding "decrease of resins." Findings based on such an extraction method do not necessarily indicate that the "disappearing" resins, etc. actually have undergone drastic chemical changes, such as, *e.g.*, a complete combustion. Rather, they can also be interpreted by a formation of high molecular polymers and condensates that have become insoluble in the solvents used for the extraction of the resins, or, in an opposite sense, by the conversion of part of the resinous substances into materials soluble in alcohol or water,* forming thereby molecular or colloidal solutions. This ambiguity of the extraction method, and particularly the lack of precise chemical data on the composition of the resins, has so far prevented any substantial progress in discovering the chemical fate of the amounts that disappear analytically during fermentation.

It appears likely that a minor part of the total loss in resins can be explained by the evaporation of essential oils during fermentation. The presence of such oils in the gases and vapors evolved during fermentation has been confirmed qualitatively (58,202,203). It is quite possible that some of these volatile oils have been formed during the fermentation from less volatile components of the resinous compounds. Another part of the loss of total resins may possibly be ascribed to polymerizations which, during the fermentation process, transform previously ether or petroleum ether soluble substances into insoluble material.

* In some of the analytical schemes for the determination of resins, the solvent extraction of tobacco is preceded by its extraction with alcohol or water.

Some indications concerning the disappearing part of the resins may be obtained from the changes observed for specific weight, refractive index, acid number, ester number, and saponification number of that part of the resins left in the leaves after fermentation. After fermentation, the resins show an increase of the components that have a diminished solubility in ethyl ether and a decreased iodine number (203). This may indicate the formation of higher molecular, less unsaturated products (112,113,214). Observations made for the volatile oils in fermented tobacco also point to an increasing saturation of double bonds and to an accrual of esters in these oils (194). However, since in most of these investigations different methods were used by the several authors and since the chemical interpretation of the solubility shifts and of the changes of characteristic numbers is a matter of intuition rather than of concise knowledge, it is preferable to refrain from discussing the various assumptions which can be made about the changes of the tobacco resins.

(f) **Pigments.** The natural pigments of the leaves consist mainly of chlorophylls a and b, carotene and xanthophyll (27,59)—all of which decrease during fermentation. Chlorophyll itself undergoes its main change during shed curing; between 80 and 90% is transformed during this early phase into unknown compounds, with a simultaneous disappearance of the green color of chlorophyll. While the chlorophyll content of freshly harvested mature tobacco leaves amounts to 0.20 to 1.40% of the dry leaf weight (49,75),* not more than about 0.02 to 0.30% of chlorophyll is left in the leaves prior to fermentation. Of these small residual amounts, at least one-half is further changed into colorless products during fermentation (9,18). No systematic work has been done on the behavior of carotene and xanthophyll during fermentation. According to Evans and Weeks (49), and to Griffith and Jeffrey (75), the average carotene contents of green tobacco leaves lie at about 0.01 to 0.07% and moderate decreases of these compounds have been found in the curing phase (231). Almost no quantitative data exist for the xanthophyll content of tobacco leaves, except a principally qualitative investigation by Stuart B. LeCompte (132) and optical determinations by Evans and Weeks which were not evaluated in terms of quantities of xanthophyll. It can be expected that the percentage of xanthophyll in tobacco leaves amounts roughly to one-half of the percentages found for the carotenes, from inference of values found for the leaves of other vegetable materials.

In addition to the pigments extractable from tobacco by solvents

* As a rule the top leaves of the tobacco plants contain the highest percentages and the bottom leaves, the lowest percentages of these pigments.

for fatty substances, the leaves contain water-soluble colored compounds not extractable by the solvents used for chlorophyll, etc. They consist mainly of flavones and flavonoles and belong chemically to the group of the phenolic leaf ingredients (87a,191,192,215).

(g) Phenols, Polyphenols, and Tannins. Phenols and polyphenols have been mentioned repeatedly in the previous text as constituents of the tobacco leaf that probably play an essential role as oxygen-transferring agents in the fermentation process. In spite of this, the chemistry of the phenolic compounds in tobacco leaves and their fate during the fermentation have received only limited attention. A few phenolic compounds have been identified or isolated, such as small quantities of volatile phenols (146), and caffeic and chlorogenic acid (117,195,198). Related to these typical phenolic compounds are the flavones and flavonoles of which rutin (35-37,84, 85,101,125,149,151,166) and isoquercitrin (87a,123) were found and closely studied. Recent chromatographic and spectroscopic studies indicate the presence of at least four different flavones in cured unfermented leaves of Burley tobacco (87a,191,192,215). The tannins of tobacco, which probably resemble the tannins of the tea leaf (27, 181,182) by containing the chroman ring, also belong to the class of compounds characterized by di- or triphenolic groups. The main difficulty with the entire class of phenolic compounds is the lack of satisfactory and dependable analytical methods that would permit exact determination of their total quantity and of their individual composition.

A conventional method of determining polyphenols and tannins (27) consists in measuring the total reducing power of aqueous tobacco extracts (*e.g.*, by means of KMnO_4 titration), then removing the polyphenols and tannins either by precipitation with lead acetate or by adsorption on hide powder and determining the reducing power of the residual filtrates, which is ascribed to the reducing sugars. The substances removed with the lead precipitate or as adsorbate on hide powder are evaluated by difference, in terms of their "reducing power." The latter is attributed to polyphenols and tannins and is converted to weights of these substances by means of more or less arbitrarily chosen factors. Evidently these analytical procedures are not very dependable and certainly not sufficient for identifying a specific member of the polyphenolic group. Furthermore, they are too crude to detect any finer chemical changes of these compounds as they may occur in the fermenting leaves.

Another approach to the determination of phenols and tannins in tobacco tissues may be seen in the measurements of oxygen uptake by minced leaves (179,181, 182). This method is also nonspecific in regard to type of phenolic compounds in

the substrate. In view of its indirect character and of its dependence on additional factors which influence the capacity of the leaf macerates for oxygen uptake, the quantities of phenolic compounds present in a given specimen can merely be estimated. Nevertheless, this method is valuable because it offers some information on the nonreversible oxidation or polymerization of the polyphenolic compounds in a given specimen by means of following the gradual decrease of its oxygen uptake (see page 349).

A fully satisfactory analytical procedure would have to be based on a quantitative separation of the phenols, polyphenols, flavonols, and tannins from the other leaf components, and on the determination of individual compounds in this fraction. The accomplished isolation of several individual phenolic compounds such as rutin may point the way to such an improved analysis.

In spite of the primitive analytical tools, it hardly can be doubted that the amounts of polyphenols, tannins, and flavonols decrease during fermentation as far as their phenolic hydroxy groups are concerned (106,135,179-182). For Pennsylvania cigar leaf tobacco, a decrease of tannins and polyphenols was found by us (58) from 0.48% B.F. to 0.36% A.F. by means of determinations of the reducing capacity of extracts before and after removal of the tannins with lead acetate.

These low figures indicate merely that a very considerable portion of the phenolic hydroxy groups has disappeared, even before fermentation. Average values for "total polyphenols" are 2 to 3% (106,173).

Of the few identified polyphenolic compounds, rutin is, according to Couch (36), almost completely, or is completely, absent in fermented leaves, even if its prefermentation amount in the leaves was considerable (0.5 to 1.5%). It is commonly assumed that these substances, including chlorogenic acid, disappear by means of oxidation and polymerization to brown tannin-like condensation products (84,85, 117,149-151). Several independent observations indicate that the phenolic constituents in leaf tissues can act as oxygen donors and as hydrogen acceptors and that, in this way, they promote the oxidative changes of a number of other substances. As was pointed out previously, the oxidative consumption of carbohydrates is possibly enacted by such a polyphenol-controlled mechanism after the natural enzyme complex which normally sustains the respiration of the leaves has become inactive.* Indications for a replacement of the native

* According to Bonner and Wildman (22), polyphenol oxidase is the principal terminal oxidase for the respiration of spinach leaves. Robinson and Nelson (183) and Baker and Nelson (6) have come to similar conclusions for the respiration of

enzyme system of respiration by a polyphenolic mechanism were obtained by Roberts (179-182) by means of observations on macerated leaves, and by the studies of Obabko (156). Obabko showed that, after destruction of the original oxidases in tobacco leaves by high temperatures, a resumption of the oxidative reactions can take place and is probably achieved by means of polyphenolic substances. The capacity of the polyphenols to act as redox catalysts in oxidative reactions may extend even farther. There are various indications that the oxidation and dehydrogenation of several nitrogenous compounds in the leaves, particularly of amino acids (Sect. III C 4e), occurs with the active participation of polyphenolic compounds. It appears that intermediate compounds are formed between the nitrogenous substances and the polyphenols and that, by way of these complexes, the polyphenolic components act as both hydrogen acceptors and oxygen donors toward the nitrogenous compounds (page 383).

3. Insolubilization of Water-Soluble Leaf Components

Before we take up the *nitrogenous components* of the tobacco leaves and their fate in the fermentation process in detail, it will be useful to discuss a characteristic over-all effect that accompanies the sweat of cigar tobacco (60). This effect consists in a transformation of *water-soluble into water-insoluble substances within the leaves*.

Water solubility tests are made by means of one-hour reflux extraction with boiling water at the natural pH of the leaves. Acidification of the water up to pH 3 does not change the results.

Numerically, this shift appears to be very considerable if the analytical results obtained directly as percentages in the unfermented and in the fermented leaves are compared. For instance, the average values found in this laboratory for 30 samples of the 1939 crop of Pennsylvania Seedleaf tobacco were: *B.F.*—41.8% water-soluble solids and 58.2% water-insoluble solids; *A.F.*—35.5% water-soluble solids and 64.5% water-insoluble solids. The corresponding analytical results for the 1941 crop (30 samples) were: *B.F.*—45.8% soluble, 54.2% insoluble; *A.F.*—37.9% soluble, 62.1% insoluble. In very

the potato tuber. Boswell (23) reports that caffeic and gallic acids may act as carriers in this system. Szent-György (211) expressed the view that flavonols form part of the oxidation-reduction chain in the plant cell. In the living tea leaf, respiration seems to be enacted by another mechanism, despite the presence of considerable amounts of polyphenols, and of polyphenoloxidase (134).

well sweated leaves the decrease of the water-soluble fraction can be as great as from 47.3% B.F. to 32.5% A.F. When the A.F. values are expressed in percentages of the prefermentation weight of the leaves, and when the total weight loss during fermentation is apportioned to the two fractions of the water-soluble and the water-insoluble leaf constituents, the actual shifts prove to be smaller than would appear from the directly determined percentage values quoted above. Nevertheless, there can be no doubt that roughly 3 to 5% of water-soluble substances become water-insoluble during fermentation in the leaves of Pennsylvania Seedleaf tobacco. Further investigations prove that *ca.* $\frac{1}{6}$ to $\frac{1}{3}$ of the insolubilized substances are *inorganic* in nature. They consist mainly of calcium—phosphates, oxalates, and pectates. A large fraction of the calcium phosphates turns into a water-insoluble form in the fermented leaves because of the higher pH values of the latter. The increased amounts of calcium oxalates and calcium pectates obviously result from the formation of additional quantities of the corresponding acids in the sweat process (see page 366). Taking into account this insolubilization of inorganic compounds, there still remain between 2 and 3% of *organic* substances which lose their water solubility during the fermentation process. In very thoroughly fermented leaves this change in solubility of organic components can involve quantities up to 5% of the dry tobacco weight. We shall see (page 381) that nitrogenous substances are involved to a considerable extent in this effect and that the insolubilization is probably caused by complex formation between oxidized polyphenols and amino acids, followed by polymerization of these complexes to high molecular products.

4. Nitrogenous Compounds

(a) **Analytical Methods and Earlier Results.** Our knowledge of the nitrogenous substances of tobacco is fairly satisfactory. The possibility of determining the total nitrogen content of the whole leaves, and of leaf extracts and fractions thereof by a properly modified Kjeldahl method, permits a quantitative accounting for the distribution of the organically and inorganically bound nitrogen among the identifiable and still unknown nitrogenous compounds.

In order to account for all the nitrogen, including the nitrogen of the heterocyclic leaf components, we found that a very thorough digestion method had to be developed with repeated addition of selenium and of mercury as catalysts. See also the work of Ogg, Brand, and Willits (157,245).

Furthermore, the analytical methods for determining the main components of the nitrogenous sector, *i.e.*, for the proteins, ammonia compounds, amino acids, amides, nitrates, and alkaloids, are more specific and accurate than many of the methods available for the non-nitrogenous compounds.

Since the beginning of scientific investigations of tobacco fermentation, observations have been reported on changes of the *ammonia* and *nicotine* contents of the leaves. In evaluating some of the early work, it must be remembered that many of the old analytical procedures were inadequate, and that the methods of fermentation applied to the investigated tobacco samples differed appreciably among themselves and from the more effective methods of today. The tobacco analyzed in some early German work was bulk-sweated, presumably without any addition of predetermined amounts of water to the leaves and without any effort to control the ambient temperatures and the air humidity—a procedure which leads to incomplete and varied results if compared with the improved fermentation methods of today. Nevertheless, fairly consistent results are reported even in the older literature as far as the general trend of the chemical conversions of the nitrogen compounds is concerned. Some results of these earlier investigations are listed in Table VIII (see also 17,18,67, 105,111,114,118,220).

In more recent years, extensive and systematic studies of the fate of the nitrogenous compounds in cigar tobacco leaves have been carried out in the author's laboratory (58-62). These studies involved the development of appropriate and dependable analytical methods, and led automatically to a more intensive exploration of some of the hitherto unidentified nitrogenous compounds that emerge as a result of the fermentation. One feature of this new scheme of analysis of the water-soluble nitrogenous compounds in the leaves is that it is carried out in steps by determining successive fractions of nitrogenous substances in one given leaf sample until a complete accounting of the total "soluble nitrogen" has been achieved in quantitative agreement with an over-all determination of this amount. Table IX gives a condensed picture of some recent analytical findings obtained by this method. The values in this table are based on the results of several hundred analyses of various samples of different crops.

(b) Total Nitrogen Balance. During a successful fermentation, nitrogen compounds are lost from the leaf tissues. This loss is of

TABLE VIII
SOME NITROGEN COMPOUNDS IN CIGAR TOBACCO LEAVES AND THEIR CHANGES CAUSED BY FERMENTATION — EARLY RESULTS

Nitrogen fractions	All values expressed in per cent of tobacco dry weight before fermentation						General trend
	Time	Nessler (147)	Konstanty (122)	Behrens (12)	Jenkins (94)	Kearbill (124)	
Total N	B.F.	3.09	4.45	2.70	4.09	3.76	Decrease by about 10%
	A.F.	3.09	4.18	2.47	3.83	3.15	
	Chg.	None	-6%	-8%	-6.5%	-16.2%	
Protein N	B.F.	1.30				1.76	Doubtful, relatively small changes
	A.F.	1.30				1.48	
	Chg.	None	Increase			-15.9%	
Ammonia and amide N	B.F.		Increase to double value	0.72	0.18	0.37	Considerable increases and decreases from -70% to +80%
	A.F.	No increase		0.70	0.16	0.49	
	Chg.	Not detd.		-3%	-11%	+32%	
Nicotine N	B.F.	0.25	0.56	0.18	0.30	0.73	Decrease by about 15 to 50%
	A.F.	0.18	0.37	0.10	0.25	0.33	
	Chg.	-28%	-32%	-44%	-16%	-55%	
Amino acid N	B.F.						No data
	A.F.						
	Chg.	Not detd.				Not detd.	
Nitrate N	B.F.	(0.05) ^a	0.63	0.85	0.93	(0.26) ^a	Doubtful, relatively small increases and decreases
	A.F.	(None) ^a	0.60	0.89	0.76	(0.08) ^a	
	Chg.		-5%	+4.7%	-17%	(-70%) ^a	
Amide N	B.F.					0.35	
	A.F.					0.83	
	Chg.					+140%	

^a In view of the analytical methods used, these values are doubtful.

TABLE IX. NITROGENOUS COMPOUNDS DURING RESWEAT PHASE OF FERMENTATION OF PENNSYLVANIA SEEDLEAF TOBACCO—AVERAGE CHANGES (ALL VALUES EXPRESSED AS NITROGEN OF EACH COMPONENT, AND AS WEIGHT OF EACH COMPONENT, IN PER CENT OF DRY WEIGHT OF LEAVES BEFORE RESWEAT)

No. (1)	Type of nitrogen compd. (2)	B.F. value		A.F. value		Change in % of dry wt. of leaves		Remarks (see text for details)
		In terms of N proper (3)	Of compts. (4)	In terms of N proper (5)	Of compts. (6)	In terms of N proper (7)	Of compts. (8)	
(1)	Total N	4.66	24.02	4.04	22.78	-0.62	-1.24	Loss due mainly to evapn. of about 0.47% NH ₃ N and some 0.10% nicotine N, and to some leaching effect by H ₂ O during casing operation
(2)	Insol. N (protein N plus N of insolubilized complexes of amino acids and quinones)	1.88	11.75	2.16	13.50	+0.28	+1.75	Increase of insol. N, probably by formation of polymerized quinone-amino acid complexes and by further condensations and polymerizations
(3)	Soluble N (see 3a to 3i)	2.78	12.27	1.88	9.28	-0.90	-2.99	Net result of changes 1 and 2
(3a)	Ammonia N plus amide N	0.93	1.12	0.51	0.62	-0.42	-0.50	Decrease is apparent only because of volatilization of acdnl. 0.50% NH ₃ N; see (1) Remarks above
(3b)	Amino acid N	0.31	1.85	0.11	0.65	-0.20	-1.30	Mainly oxidized to NH ₃ and α-keto acids
(3c)	Nicotine N	0.64	3.71	0.18	1.04	-0.46	-2.67	Partly transformed (see 3i), partly (0.10%) volatilized (see 1, Remarks)
(3d)	Secondary alkaloid N (mainly, nornicotine N)	0.08	0.40	0.05	0.25	-0.03	-0.15	This fraction also contains very small amt. of other alkaloids, probably myosmine and others
(3e)	Nitrate N	0.34	1.53	0.33	1.49	-0.01	-0.04	Small and irregular changes within limits of sampling and analytical errors
(3f)	N of water-sol. complexes of amino acids and quinones	0.13	1.56	0.14	1.75	+0.01	+0.19	
(3g)	N of unknown acidic compounds	0.14	0.84	0.11	0.66	-0.03	-0.18	Consists of: (1) oxidation products containing 2 O atoms attached to nicotine; (2) an unknown pyridine deriv.; (3) nicotinic acid
(3h)	Unknown N	0.17	1.02	0.17	1.02	±0.0	±0.0	
(3i)	N of alkaloid transformation products	0.04	0.24	0.30	1.80	+0.26	+1.56	

the order of magnitude of 0.4 to 0.6% of the dry tobacco weight, or of roughly 10 to 15% of the total prefermentation nitrogen contained in the leaves. Ammonia and nicotine have been found to be evolved from the leaves during the fermentation process, particularly during the phase of resweat. The total amount of the bases volatilized from the tissues have not yet been determined quantitatively (Sect. IIB2f) due to the difficulty of collecting all the gases and vapors given off during the entire period of fermentation, shaking, re-packing, and additional handling without disturbing the sweat process. However, some information has been obtained on the *relative* distribution of the evaporating ammonia nitrogen, nicotine nitrogen, and unidentified nitrogen by condensing the vapors evolved from a number of cases of fermenting tobacco, together with the water vapor given off by the sweating tobacco, in a large vacuum chamber. By analyzing the aqueous condensate obtained in this way the ratio of ammonia nitrogen to nicotine nitrogen to nonidentified nitrogen was found to equal 75.5:15.3:9.2. Accordingly, a 0.62% average loss of total nitrogen from the leaves can be interpreted as consisting of roughly 0.47% ammonia nitrogen, 0.10% nicotine nitrogen, and 0.05% nonidentified nitrogen. Small amounts of nitrogen are also lost from the leaves by "leaching" during casing (see page 360). However, these amounts have been found to be negligible compared with the losses by evaporation.

(c) Increase of Water-Insoluble Nitrogen. (1) *Magnitude of effect.* Many hundreds of Pennsylvania Seedleaf tobacco samples were analyzed by us (60) for their nitrogenous constituents before and after fermentation. (In most of the analyses, the leaves were analyzed before and after resweat. This means that the "prefermentation" values for these leaves already include the changes caused by their natural sweat.) They all showed a definite *increase of nitrogen in their water-insoluble* fraction, provided they had responded well to the fermentation. (Samples which do not respond to fermentation show correspondingly smaller or no changes, particularly as far as their alkaloid contents are concerned.) This effect was carefully investigated in detail because of the obvious objection that the observed increase of insoluble nitrogen is merely an apparent one, and actually a result of the total weight loss of the tobacco in the fermentation. However, the analytical values show a real increase of

insoluble nitrogen,* even after proper correction for the weight losses. If, instead of water, various aqueous solutions, such as 5% acetic acid or alkaline CuSO_4 solutions (Barnstein method), or water-alcohol mixtures are used in the analytical procedure for the extraction of the soluble nitrogen fraction, the values of insoluble nitrogen found in the fermented samples exceed those of the unfermented samples by the same margin found for the samples extracted with water only. The plus value of insoluble nitrogen in the fermented leaves remains unchanged even when part of the leaf proteins is brought into solution by means of an alkaline, mildly hydrolyzing extractant. Hence, the newly formed, water-insoluble nitrogen substances seem to resist chemical attack better than the leaf proteins proper.

(2) *Chemical Background of Insolubilization. Complex Formation of Amino Acids and Quinones.* Evidently, we again encounter the previously described insolubilization of organic leaf components by fermentation, with the additional and independently obtained information (58) that these insolubilized substances contain 7 to 10% of nitrogen. This weight relationship, the simultaneous disappearance of amino acids from the soluble fraction, and the dark brown coloration of the insoluble fraction of the fermented leaves have led us to the conclusion that we are probably dealing here with *products formed by a condensation of amino acids with polyphenols*. The formation of such complexes deserves further investigation beyond its bearing on the insolubilization of nitrogen compounds, because, possibly, they play an important role in the chemical fate of the amino acids (see page 383).

There is an obvious parallelism between the formation of water-insoluble complexes of amino acids with phenolic substances in sweating tobacco leaves and the reactions occurring in the fermentation of *tea* leaves (179-182). Here too, dark brown, water-insoluble condensation products are formed which contain considerable amounts of nitrogen. With tea, the effect is still more conspicuous than in the tobacco leaf, due to the higher content of polyphenols and tannins in the former.

(d) **Balance of Nitrogen Shifts.** Column 7 of Table IX lists the losses and gains of the individual nitrogen compounds of cigar tobacco during fermentation as derived from many analyses made in our laboratory. The largest over-all effects are the following:

* The A.F. values listed in Table IX are all corrected for weight losses. The "protein nitrogen" increase of about 0.28% exceeds by far the analytical and sampling errors.

1. *Loss of nitrogen compounds by evaporation and by leaching during the casing operation.*
2. *Conversion of soluble into insoluble nitrogen.*
The net result of changes 1 and 2 is:
3. *Loss of soluble nitrogen.* Specifically, this over-all change of the soluble nitrogen compounds is a composite effect caused by the following individual reactions:

Loss of

- (a) ammonia and amide nitrogen
- (b) amino acid nitrogen
- (c) nicotine nitrogen
- (d) "secondary alkaloid" nitrogen

Loss (d) is definitely established, but it is smaller both in absolute amounts and in terms of percentage decrease than the decrease of nicotine nitrogen.

Small and erratic changes of

- (e) nitrate nitrogen
- (f) water-soluble complexes of quinones and amino acids
- (g) nitrogen of unknown acidic compounds
- (h) unknown nitrogen

At first approximation the substances listed as (e) to (h) can be considered to remain stationary during the fermentation.

Increases of

- (i) Insoluble nitrogen compounds
- (j) "alkaloid transformation products"

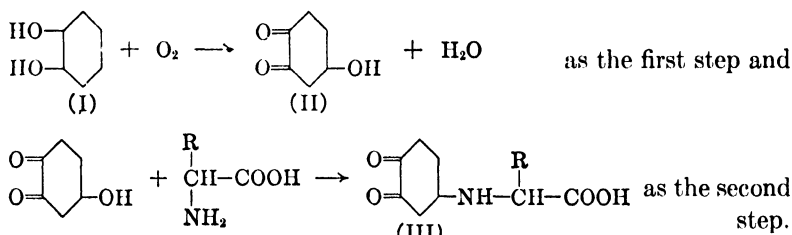
(e) Fate of the α -Amino Acid Nitrogen. As pointed out above, a considerable part of the amino acids seem to condense with polyphenols or quinones. Our analytical results indicate that these complexes are not quantitatively polymerized to water-insoluble products; an appreciable part seems to remain in a soluble form in the leaf tissues.

This conclusion is supported by the following observations (58) made in our laboratory: (1) Aqueous extracts of fermented leaves contain relatively small amounts of free amino acids but readily yield higher amounts if subjected to very mild hydrolysis; the conditions of this hydrolysis would be insufficient for the split of peptides and polypeptides. (2) After the quantitative removal of all the alkaloids from an aqueous tobacco extract, substances remain in these extracts that give a brown precipitate with silicotungstic acid. One part of these products consists of alkaloid transformation products (see page 392), and another, of compounds the nitrogen content of which corresponds to what can be expected for condensation products of amino acids with polyphenols of the catechol type.

Further detailed, quantitative studies will be necessary in order to

obtain a more concise and consistent picture of the nature and properties of these complexes. According to present indications, their formation seems to be an essential step in fermentation of cigar tobaccos.

Some recent publications show that condensation products between α -amino acids and oxidized forms of *o*-diphenolic compounds are formed in other plant tissues, and that this reaction is of general importance because it can lead to the *indirect enzymic oxidation of excess amino acids*. James, Roberts, Beevers, and DeKock (92) have demonstrated that the oxidation of catechol (I) to *p*-hydroxy-*o*-benzoquinone (II), under the influence of the catechol oxidase of *Atropa belladonna* in the presence of amino acids, yields a red-brown colored condensation product (III) formed from *p*-hydroxy-*o*-benzoquinone and the amino acid.



The complex III catalyzes (even without further cooperation of the polyphenol oxidase) the *oxidation of excess amino acids which decompose thereby into ammonia and α -keto acids*. Jackson and Kendal (90) have investigated the oxidation of catechol and homocatechol by mushroom tyrosinase in the presence of amino acids. According to these authors, complexes are formed between the *o*-quinones obtained by oxidation of the catechols, and various substances with primary or secondary amino groups. In crude mushroom extracts, catechol forms a purple imino complex with *l*-proline, an amino acid present in appreciable amounts in mushroom tissues. Analogous complexes were synthesized by Jackson and Kendal in which hydroxyproline, hydroxyproline ethyl ester, pyrrolidine, glycine, dimethylamine and methylamine were condensed with the *o*-quinone. The condensation occurs in the para position to one of the quinoid groups by direct linkage with the nitrogen of the amino group. In further

TABLE X
CHANGES IN AMINO ACID NITROGEN DURING PROCESSING OF TOBACCO LEAVES

All figures represent percentages of the dry tobacco weight at the start of the processing

Stage of processing	(I) N of insol. amino acid-quinone complex	(II) Amino acid N	(III) N of water-sol. amino acid-quinone complex	(IV) Ammonia and amide N by oxidation and deamination
Before curing		1.55%		
In cured leaf	+0.25	-0.95	+0.10	+0.60
	0.25	0.60	0.10	0.70
In leaf, after natural sweat	+0.10	-0.25	+0.05	+0.10
	0.35	0.35	0.15	0.80
After resweat	+0.10	-0.20	no change	+0.10
	0.45	0.15	0.15	0.90
				0.55
				0.35
				-0.35
				0.35

Found as total increase of insol. N

Water-sol. amino-quinone complex, pptd. by silicotungstic acid

Amino acid N after resweat

Ammonia N in leaves after resweat

Lost by evapn. Equals major part of loss of total N

agreement with James *et al.*, Jackson and Kendal found that the complexes formed with glycine catalyze the oxidation of excess amino acids with liberation of ammonia. The imino acid complexes, such as the proline complex, seem to be inactive as oxygen-transferring agents.

In their paper, Jackson and Kendal cite earlier work (11,23,32,83, 91,163,193) in which the same type of reaction had been observed. The discovery of these reactions and the specific property of some of the complexes formed to act as redox catalysts toward excess amino acids may be of considerable importance for the entire field of nitrogen metabolism in plants, particularly since according to Street (206) no specific amino acid oxidase resembling the enzyme present in animal tissues has been found in vegetable materials.

All these studies prove that in plant tissues reactions can occur between polyphenols and amino acids of the same general type as we are led to assume from our studies of tobacco fermentation.

The quantity of amino acids reacting in this manner is obviously dependent on the amount of polyphenols which becomes available in the leaf tissues. Since the quinone - amino acid complexes, according to the British authors quoted, catalyze the oxidative deamination of excess amino acids to ammonia and α -keto acids, probably most* of the ammonia present in fermented tobacco leaves is derived from amino acids by this or a related mechanism. The over-all conversion of amino acids into ammonia in the leaves is of considerable magnitude. In the curing process (see Part I, pages 341-342, and Table VIII there), of about 1.5% α -amino acid nitrogen obtained from the protein hydrolysis, about one half appears immediately in the form of ammonia nitrogen (see Table X). Although a native α -amino oxidase of the leaf tissues may participate in this initial phase of rapid oxidative deamination of the amino acids, the simultaneous browning of the leaves and the early appearance of polyphenols in the "sphere of reaction" within the tissues (see page 346) imply that the formation of quinone - amino acid complexes is already in operation at this early time and that ammonia formation from excess amino acids is at least partly due to the catalytic function of this complex. After curing, the leaf contains some 0.60% of still unreacted amino acid nitrogen and some 0.7% ammonia plus amide nitrogen in its water-soluble frac-

* Smaller amounts may originate from the amide nitrogen of glutamine and asparagine (217-224) and also from urea (177).

tion. During the *natural sweat*, the process of deamination continues, being manifested by three typical signs: (1) decrease of amino acids, (2) increase of ammonia, (3) increase of water-insoluble nitrogen. Effects 1 and 3 are easily detected by analyses of leaves before and after their natural sweat. The same applies for effect 2 provided that the ammonia nitrogen lost by evaporation is included in the total balance. During *resweat* this transformation proceeds still further, the only difference being that the gradual shift of the pH of the leaves toward alkalinity accelerates the evaporation of the liberated ammonia from the tobacco.

(f) **Balance for α -Amino Nitrogen** (see Table X). The over-all result of all these changes is that, of about 1.5% of amino acid nitrogen originally contained as such in the leaf proteins, some 90% (or 1.4% of the leaf weight) is converted into other products. (Some 10%, or *ca.* 0.15% amino acid N, escapes deamination and is found in the water-soluble extract of the fermented leaves.) Of these products, about 0.45% of the leaf weight appears as "insoluble nitrogen," which is probably identical with a highly polymerized form of the brown quinone-amino acid complex. Smaller amounts of this complex (about 0.15% of the leaf weight) remain water-soluble and can be traced by silicotungstic acid precipitates (see page 382). The remaining 0.9% amino nitrogen is converted into ammonia of which about 0.35% evaporates from the tobacco at a gradually increasing rate, so that finally only about 0.5 to 0.6% ammonia nitrogen is left in the leaves. The conversion of α -amino acids into these products persists throughout all the stages of processing and is apparently controlled by the speed with which unreacted polyphenols seep through the cell walls and enter the amino-acid-containing area of the leaf tissues.

It would be important to study these significant reactions in more detail, particularly with the aim of identifying the specific polyphenolic compounds and the types of amino acids involved, as well as the nature of the enzymic or catalytic components that initiate the primary oxidation of the phenols to quinones.

(g) **Fate of the Alkaloids.** (1) *General Correlations.* In contrast to the uniform pace at which the reaction of the amino acids proceeds through all the phases of the tobacco processing, the disappearance of *alkaloid* nitrogen, and particularly of *nicotine nitrogen*, remains dormant in the curing phase and reaches but moderate pro-

portions during the natural sweat. In the phase of resweat, however, it develops into the dominating process. This characteristic difference in timing makes it *de ipso* unlikely that the *o*-quinone-amino acid complexes act as catalysts also for dehydrogenation or oxidation of the alkaloids in the same way as they do for the oxidation of excess amino acids. James, Beevers, Roberts, and DeKock (92) as well as Jackson and Kendal (90) have shown that the complexes formed between *secondary* amines and quinones are inactive as redox catalysts, and that no complex formation occurs between *tertiary* amines and quinones. Furthermore, no indications exist for the catalysis of alkaloid dehydrogenation or alkaloid oxidation by the qui-

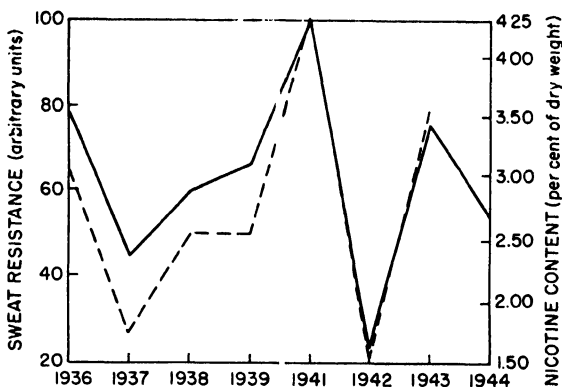


Fig. 1. Nicotine contents (—) and sweat resistances (---) of various groups of Pennsylvania seedleaf tobacco in average values per crop.

none-amino acid complexes. Nicotine is a tertiary nitrogen base, and the amounts of "minor alkaloids," such as nornicotine, that contain a secondary basic nitrogen atom are relatively small in cigar tobacco leaves. Hence, it appears unlikely from a chemical viewpoint that the transformations of the tobacco alkaloids proceed by the same mechanism as do the conversions of the amino acids.

The quantities of alkaloids present in the tobacco leaves prior to resweat exert a controlling influence on the intensity and speed of fermentation. Furthermore, the rate at which the alkaloids disappear "analytically" from the leaves runs strictly parallel to the intensity and thoroughness of the fermentation as manifested by the typical

external signs of a "good sweat." Extensive studies with many samples of various crops of cigar leaf tobacco (58) have led us to the following specific conclusions:

(1) The higher the initial alkaloid content of a given cigar leaf tobacco sample, the higher its "sweat resistance"* (see Fig. 1).

(2) The larger the percentage decrease of the alkaloids in the resweat of a given sample, the better its "sweat rating."

(3) The lower the final alkaloid content of a sweated sample, the higher its quality as a smoking tobacco.

It would be an oversimplification to conclude from these findings that the conversion of alkaloids into other products is the sole purpose of the resweat operation. Rather, it appears likely that the removal of the alkaloids, being desirable *per se*, is still more important in its consequences, insofar as it eliminates with the alkaloids typical inhibitors of oxidative reactions.

Inhibitive effects of nicotine on oxidative reactions have been observed for simple oxidations in liquids (63).

The resweat seems to operate by way of a "trigger mechanism" which, with the removal of the alkaloids as initial obstacles, leads to the oxidative conversion of incomparably larger amounts of other leaf components. The inhibitory effect of the alkaloids on the reactions typical for resweat is clearly demonstrated by the great difficulty of initiating resweat, as observed by rise of temperature, change of pH, improvement of smell, and weakening of texture with samples that contain alkaloid nitrogen exceeding values of about 0.60%, or roughly 3.4% of nicotine. The gradual decrease of the alkaloids during resweat leads to an increasing intensification of the reactions in the leaf tissues during the sweat process (temperature rises, etc.), an effect which is counteracted later on by loss of water from the leaves. As a result, leaves rich in nicotine show a maximum of sweating activity at some point around the half-way mark of the resweat process.

(2) *Specific Analytical Methods for Alkaloids.* The decrease of nicotine during fermentation has been known since the earliest chemical studies of this process (8,12,13,17,19,50,57,67,122,135,147). How-

* The "sweat resistance" of a given sample of tobacco is higher, the larger the number of heat shakes and amounts of casing water required to ferment it satisfactorily and the longer the duration of its resweat.

ever, very little work has been devoted to the investigation of the causes for this decrease and of the chemical fate of the disappearing alkaloids. Occasionally, the disappearance of the alkaloids, in spite of insufficient experimental evidence, was ascribed to their transformation into ammonia or methylamine or pyridine, or to an evaporation of the alkaloids from the leaves. The main reason for this uncertainty in regard to the chemical fate of the alkaloids was the lack of good analytical methods or, rather, of efficient organic chemical methods to be employed in the search for any conversion products. In recent years, in the author's laboratory, a systematic study of this specific problem was undertaken in which special methods, including color reactions specific for pyridine compounds, selective solvent extractions, and optical methods (209) were developed for the purpose of obtaining more detailed information on the chemical reactions resulting in degradation of the alkaloids (60a,61,62).

(3) *Nature of Alkaloid Conversions.* These studies have not yet been completed. However, they leave no doubt that stepwise dehydrogenations and oxidations are the main reactions that lead to the disappearance of a large proportion of nicotine and of the minor alkaloids. Parallel to this chemical conversion runs a moderate volatilization of the alkaloids and, just as in the case of the evaporation of ammonia, it reaches its highest rate toward the end of the resweat process as a result of the *pH* shift. Removal of the inhibiting nicotine leads to an intensification of additional oxidative reactions, including oxidative removal of organic acids. This removal of acids shifts the *pH* of the leaf tissues toward higher values. Hence, the decrease in alkaloids accelerates itself after a slow start. As a rule, nicotine-rich, and therefore sweat-resistant, tobacco shows a definite induction period of its resweat activity during which the alkaloid content drops only slightly.

(4) *Disappearance of Nicotine and Nornicotine. Presence of Minor Alkaloids.* The major alkaloid present in cigar leaf tobacco is, as a rule, nicotine (59). (Nornicotine is the major alkaloid in certain cigarette tobaccos—see Part I, page 345.) Depending on growing conditions, the amount of nicotine in cured leaves varies from about 1 to 5.8% (0.2 to 1.0% of nicotine nitrogen). Of the related alkaloids, nornicotine is present in smaller quantities which, in Pennsylvania Seedleaf tobacco, corresponds to approximately one-tenth of the nicotine present. We have experimental indications that additional,

small amounts of other alkaloids, probably myosmine and possibly some other related alkaloids, are contained in cured cigar tobacco leaves (62). However, the amounts of these minor alkaloids seem to be limited to the order of magnitude of about 0.05 to 0.15% (0.01 to 0.03% of alkaloid nitrogen). After a satisfactory* fermentation, the nicotine content of the leaves drops to a value between 0.15 to 1% (0.03 to 0.2% of nicotine nitrogen). In extremely well sweated leaves, the nicotine content can even drop to practically zero. This large

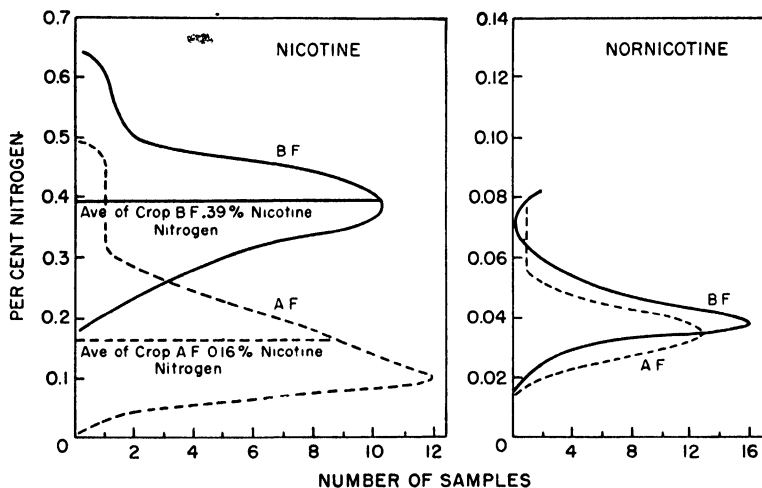


Fig. 2. Frequency distribution of nicotine and nornicotine in thirty samples of the 1939 crop of Pennsylvania Seedleaf tobacco, before (B.F.) and after (A.F.) fermentation.

decrease corresponds to the disappearance of 60 to 90% of the nicotine present prior to fermentation. As a rule, most (about two-thirds to four-fifths) of this drastic loss of nicotine occurs during *resweat* of the leaves, particularly in the case of nicotine-rich leaves. In the previous phase of the natural sweat, the loss of nicotine is less conspicuous. Compared with the striking disappearance of nicotine during fermentation, the relative loss of nornicotine is smaller; this alkaloid decreases on an average by amounts equaling 30 to 50% of its initial amount. As to the accompanying myosmine, the analytical methods for the determination of minute amounts of this unsatu-

* In insufficiently sweated tobacco, the alkaloid content changes but little.

rated alkaloid are not yet dependable enough to warrant final conclusions regarding its changes during fermentation. However, it seems that myosmine does not decrease, but rather increases slightly, during resweat—which may indicate that it plays an important role as intermediate between nicotine and its transformation products. In Figure 2, the changes of nicotine and nornicotine are shown for 30 samples of the 1939 crop of Pennsylvania tobacco as analyzed in our laboratory. As pointed out previously, the amount of nicotine that evaporates as such from the tobacco leaves during the sweat process can be roughly estimated to about 0.58% of nicotine, based on tobacco dry weight, or to 0.10% of nicotine nitrogen, a quantity considerably smaller than the total disappearing nicotine which, in well fermented leaves, corresponds to an average of 2.9%, or to 0.50% of nicotine nitrogen.

(5) *Transformation Products of Alkaloids.* The major part of the alkaloids is transformed into substances that remain in the leaves. Some information regarding these transformation products of the alkaloids has been gathered by us in recent years (60a).

The analytical procedure employed for the discovery and study of the alkaloid transformation products consists in the quantitative removal of the alkaloids proper from tobacco powder or from aqueous tobacco extracts, followed by an investigation of the remaining fraction. Removal of the alkaloids is easily achieved since they are, in the form of the free bases, soluble in hydrocarbons like hexane, whereas their transformation products are not extractable by hydrocarbon solvents. The transformation products of the alkaloids include various classes of compounds. Some of the classes can be obtained as separate fractions.

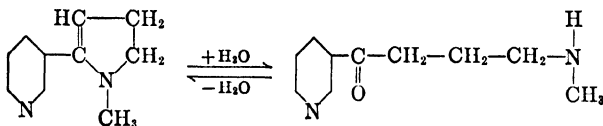
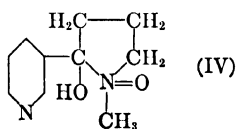
One of our methods for the detection and analysis of a first individual group* (A) of these compounds consists in precipitating them from alkaloid-free aqueous tobacco extracts with silicotungstic acid. The disadvantage of the method is that a certain amount of other leaf components, particularly substances we identify tentatively with water-soluble amino acid-quinone complexes, is precipitated by the same reagent (see page 382), together with the alkaloid degradation products. A more satisfactory, although more cumbersome, method for obtaining the "group A" degradation products of the alkaloids consists in an exhaustive chloroform extraction of tobacco powder that has been freed of its alkaloids by a previous extraction with neohexane (2,2-dimethylbutane). Chloroform does not extract the amino acid-quinone complexes. In shed-cured leaves, no alkaloid transformation products of Class A are present. After the natural sweat, small but analytically detectable amounts can be found; after the resweat, they are present in the fermented leaves in amounts of about 0.15 to 0.20% "previous alkaloid" nitrogen, corre-

* This method and further data on the analysis of nitrogenous components of the tobacco leaf will be published by this laboratory in 1950.

sponding to 0.87 to 1.16% of "previous nicotine." In other words, some 35 to 45% of the total nicotine which disappears during fermentation can be accounted for in the form of compounds contained in this Fraction A. The following properties of these substances justify their classification as transformation products of the alkaloids:

- (1) They contain the pyridine ring, just as do the tobacco alkaloids.
- (2) They increase proportionally to the decrease of the alkaloids.
- (3) They resemble the alkaloids in their ultraviolet absorption spectrum, color reaction with 2,4-dinitrochlorobenzene, and precipitation with silicotungstic acid.
- (4) About 50% of these substances can be reconverted into nicotine by nascent hydrogen.
- (5) In all their properties, the substances contained in this fraction are very similar to products obtained by L. Weil (234) from nicotine *via* its photochemical oxidation in the presence of methylene blue, which serves both as optical sensitizer and as hydrogen acceptor.

The specific structure of the Class A alkaloid transformation products is still unknown, but there can be no doubt that they are oxidation products of nicotine. The irradiation products obtained by Weil (234), which are closely related to, if not identical with, the compounds of this Class A in fermented tobacco leaves, according to Weil contain two oxygen atoms attached to one nicotine molecule. The exact position of these two oxygen atoms in the molecule is still unknown, but it is likely that one of them is linked to the methylated tertiary nitrogen atom of the pyrrolidine ring, just as is the case in oxynicotine. As to the position of the second atom, nothing definite is known. One may speculate that a compound of structure IV is a possibility because treatment of Weil's irradiation product with strong mineral acid followed by distillation, yields pseudo-oxynicotine (VI), which, according to recent investigations of Woodward and co-workers (80,246), rapidly establishes equilibrium with *N*-methylmyosmine (V) in aqueous solutions.

(V) *N*-methylmyosmine

(VI) pseudo-oxynicotine

Compound IV corresponds to the hydrated form of V with the difference that an additional oxygen atom is linked to the tertiary nitrogen atom. It is quite likely, in view of various observations made with this fraction, that the chloroform-

soluble oxidation product of nicotine is not one single compound but a mixture of closely related compounds. Further work is required to explore the constitution of this substance or substances.

Other transformation products of nicotine can be extracted by means of alcohol (Classes B and C) from tobacco which previously had been freed from alkaloids as well as from the Class A transformation products. In this alcohol extract, additional pyridine derivatives are contained which are soluble neither in hydrocarbons* nor chloroform. One of the substances present in this fraction is *nicotinic acid*, which can be ether-extracted from Fraction B plus C after acidification to pH 3 (Fraction C). Amounts ranging up to 0.04% of nicotinic acid nitrogen, or of 0.36% of nicotinic acid, were isolated (61) and determined in this way from well fermented leaves, against amounts of only about 0.003% nicotinic acid nitrogen, or of 0.027% nicotinic acid present in the same leaves prior to fermentation. Considering that the nicotinic acid derived from nicotine contains but one-half of the total previous alkaloid nitrogen, the increase of this compound during fermentation corresponds to 2(0.04 - 0.003)%, or to 0.074% of nicotine nitrogen which disappeared during the sweat of these leaves. Although the conversion into nicotinic acid involves only about one-sixth of the total disappearing nicotine, the acid formed in this way is nevertheless enough to make its quantity in fermented tobacco leaves larger by a factor of about 10 to 20 than the quantities found in any other vegetable source. Obviously, during fermentation of the leaves, the acid is formed from nicotine by oxidative removal of the pyrrolidine ring, probably *via* intermediates in which the pyrrolidine ring has been opened to an aliphatic side chain. Whether the compounds of Class A are such intermediates between nicotine and nicotinic acid is still undecided. After extraction of the nicotinic acid (C), the remaining alcohol fraction (B) seems still to contain other pyridine derivatives. The exploration of this fraction, however, has so far met with little success. Both the type and the quantity of the pyridine compounds contained therein are still very doubtful. Some semiquantitative determinations indicate the presence of roughly 0.04 to 0.06% of "previous alkaloid nitrogen" in this group.

(6) *Balance for Nicotine Nitrogen.* The fate of nicotine in fermenting leaves can be summarized according to our present knowledge shown in the accompanying scheme.

	→	0.20 unchanged nicotine nitrogen
	→	0.17 in Frac. A (nicotine with 2 oxygen atoms attached)
Nicotine nitrogen	→	0.05 unknown oxidation product in Frac. B (estimated only)
0.65 B.F. —	→	0.07 nicotinic acid nitrogen times 2 in Frac. C
	→	0.08 evaporates as unchanged nicotine nitrogen (estimate only)
	→	0.08 unaccounted for
Total . . . 0.65 A.F.		

* Nor in ethyl ether, which can be used for the extraction of the alkaloids proper instead of hydrocarbons. However, ethyl ether is somewhat less selective as a solvent whenever it contains even small amounts of water.

The numerical values given in this summary vary from one tobacco sample to the next, but they can be considered as being of the correct order of magnitude for reasonably well fermented leaves. The balance of "unaccounted for" nicotine nitrogen (0.08%) may be due to errors in the estimated values for Fraction C and for the quantities of nicotine that evaporate. More likely, however, they represent the nitrogen of degradation products which have not yet been discovered. In particular well fermented leaves in which the nicotine nitrogen content has dropped to as low a level as 0.05%, the quantities of "unaccounted" transformation products of nicotine are larger than 0.08% and can be as high as 0.12%. At the same time, the accrual of insoluble nitrogen in such very thoroughly sweated leaves exceeds considerably the quantity to be expected as the result of newly formed, insoluble amino acid - quinone complexes. This may indicate that some highly degraded alkaloid nitrogen has been shifted into the insoluble fraction. If the oxidative attack does finally destroy even the pyridine ring of the alkaloids or alkaloid degradation products,* the chance of identifying the fragments by chemical means† appears very slim. The same applies for any transformation products of a highly polymerized type that have become insoluble in the common solvents. These possibilities of a complete break-up of the alkaloids into nonidentifiable split-products must not be overlooked.

The mechanism by which these oxidations of the alkaloids are set in motion is still unknown. It has already been pointed out that the specific oxidation of nicotine deviates from the oxidative deamination of the amino acids in its timing in the course of the processing of the leaves. The question whether catalytic, enzymic, or bacterial agents cause the alkaloid degradation will be discussed later.

(h) Nitrates and Unknown Acidic and Other Unknown N Compounds. Little can be said about the remaining nitrogen components of the leaves. So far no evidence has been found for any considerable transformations of the nitrates in cigar leaf tobacco: their amounts remain unchanged during fermentation within the limits

* One chemical possibility for the opening of the pyridine ring is the substitution of a hydroxy group in 2-position in the pyridine ring. As Karrer has shown (107), this substance can be further oxidized with a simultaneous opening of the pyridine ring. Some of our measurements of the ultraviolet absorption of the minor alkaloids in very strongly fermented samples make it conceivable that measurable amounts of 2-hydroxynicotine are present in these leaves.

† The use of radioactive tracers would be indicated to solve this problem.

of analytical and sampling errors (58). There is, of course, the possibility that about equal amounts of nitrates are formed, and at the same time consumed, but this possibility appears too remote to warrant a discussion unless direct experimental evidence is obtained in its favor.

The fraction of "unknown acidic" nitrogenous compounds listed as (3g) in Table IX enters into combination with magnesium oxide when the latter is added to aqueous tobacco extracts in the course of their stepwise analysis for nitrogen components. The nitrogenous compounds contained in this fraction seem to be acidic. Possibly they comprise aspartic and glutamic acid, or acidic degradation products of chlorophyll, or nucleic acid, or substances related to lecithin. Their change during fermentation appears to be insignificant. The same applies to the "unknown nitrogen," listed in (3h), which can be assumed to contain, among other nitrogenous groups, the non- α -amino nitrogen of basic amino acids, and possibly nonalkaloid bases such as betain, choline, purine, or pyrimidine.

(i) **Ammonia.** Most of the ammonium compounds in shed-cured tobacco leaves originates initially from hydrolysis of the leaf proteins. A quantitative balance shows that a large proportion of this ammonia was not preformed in the proteins in the form of amide nitrogen. Some of the newly formed ammonia may arise from the basic groups of "basic amino acids," and some from urea and related compounds (177). However, these sources appear wholly insufficient to explain the large amounts of ammonium compounds formed. Hence, it must be concluded that an oxidative deamination of the α -amino nitrogen of amino acids is already in full swing at the time of curing (59,217-224). In fermentation this process seems to continue as outlined previously in our discussion of the amino acid - quinone complexes and their catalytic action on excess amino acids.

A corresponding considerable increase of ammonia would have to be found for the fermented leaves were it not for the fact that more and more of the free base evaporates from the leaves the farther the pH travels toward the alkaline side. Seen from this point of view, the final ammonia contents of the leaves are the result of the two counteracting factors of the formation and of the evaporation of ammonia from the tissues. Local conditions, such as temperature, air movement, and moisture content, are bound to influence to quite some extent the final ammonia content of a given sample of fermented cigar leaf tobacco.

In air-cured cigarette tobacco leaves, the pH values of which range

TABLE XI
ANALYTICAL LOSSES, REAL LOSSES, AND CHEMICAL CONVERSIONS IN CIGAR TOBACCO LEAVES DURING RESWEAT PHASE OF FERMENTATION^a

Type of leaf component (1)	Amt. A.F.		Analytical decrease in % B.F. in (5)	Real losses		Remaining in leaves after			
	Amt. B.F. in % (2)	In % B.F. (4)		In form of (6)	Amt. in % B.F. (7)	Conversion into (8)	Amt. in % B.F. (9)		
Carbohydrates ^b	2.2	0.8	0.7	1.5	CO ₂ + H ₂ O and vol. acids	1.0	Small amts. of organic acids	0.5	
Hemicelluloses (pentoses)	3.4	3.0	2.8	0.6	CO ₂ + H ₂ O and furfuraldehyde	0.6	None	None	
Pectins	13.0	11.0	10.1	2.9	CH ₃ OH + CO ₂ and furfuraldehyde	0.8	Partly demethoxylated pectin, pectic acid, galacturonic acid	2.1	
Cellulose	9.5	10.3	9.5	None	None	None	None (Oxycellulose?)	None	
Lignin	3.5	3.8	3.5	None	None	None	(Small amts. of methylated lignin)	None	
Polyphenols ^c	2.0	0.0	0.0	2.0	None	None	(Quinone, which polymerizes and forms complexes)	2.0	
Total resins, waxes, vol. oils	8.0	5.0	4.6	3.4	Unknown, probably small losses of vol. oils	0.1	More satd. and esterified resins, resin acids of changed solubility	3.3	
Organic acids ^d (ether-sol. types)	15.0	11.4	10.3	4.7	CO ₂ + H ₂ O, vol. acids (formic, acetic, valeric, etc.)	4.0	Shift from citric, malic to oxalic acid	0.7	
Nitrogenous compounds ^e	21.2	17.8	16.5	4.7	Ammonia, some unchanged nicotine (amines)	1.2	Amino acid-quinone complexes (sol. and insol.), trans-formation products of alkaloids	3.5	
Ash	16.0	17.8	15.7	0.3	Mechanical and leaching losses of SiO ₂ , Fe ₂ O ₃ , P ₂ O ₅	0.3	None	None	
<i>Total</i>				<i>80.1</i>				<i>8.0</i>	<i>12.1</i>

TABLE XI A

Carbohydrate	Amt. B.F.	Amt. A.F.		Analytical decrease in % B.F.
	in % B.F.	In % A.F.	In % B.F.	
Total reducing sugars.....	1.00	0.16	0.15	0.88
Sucrose.....	0.02	0.03	0.03	—
Starch.....	0.39	0.01	0.01	0.38
Dextrin.....	0.74	0.55	0.51	0.23
<i>Total.....</i>	<i>2.18</i>	<i>0.75</i>	<i>0.70</i>	<i>1.49</i>

TABLE XI B

Organic acids (ether-sol. types)	Amt. B.F.	Amt. A.F.		Analytical change in % B.F.
	in % B.F.	In % A.F.	In % B.F.	
Oxalic acid	2.4	3.6	3.3	+0.9
Citric acid	9.0	6.0	5.5	-3.5
Malic acid.	3.6	1.8	1.5	-2.1
<i>Total.....</i>	<i>15.0</i>	<i>11.4</i>	<i>10.3</i>	<i>-4.7</i>

^a All values rounded off to first decimal. Abbreviations B.F. = before fermentation, A.F. = after fermentation. Total observed loss of dry weight during reswheat equaled 8% of B.F. weight.

^b For details, see Table XI A.

^c The analytically disappearing amounts of polyphenols depend greatly on the special analytical method used for their termination.

^d For details, see Table XI B.

^e The values entered in columns 2 and 3 of this table for nitrogen compounds represent the sum of the usually analytically determined nitrogenous substances, i.e., of protein N (not including the newly formed insoluble N compounds), ammonia plus amide N, amino acid N, nicotine N, secondary alkaloid N, nitrate N, and N of unknown acidic compounds. Column 9 gives the sum of the newly formed compounds listed as 2, 3f, and 3i in column 8 of Table IX. The actual amounts of total N compounds, including the minor fractions which are usually not analyzed and change but little during reswheat, are equal to the values listed under 1 to 3i inclusive in Table IX.

between 5 and 6, the A.F. values of ammonia nitrogen are, as a rule, increased in respect to the B.F. values, whereas the reverse is true for cigar tobacco leaves that reach a pH between 6.5 and 7 during fermentation.

5. Summary of the Chemistry of Cigar Leaf Fermentation

In Table XI, a summary is presented of the chemical changes that occur during the resweat phase of cigar leaf fermentation. The data in this table are the over-all results of the chemical changes discussed in the preceding text. The "analytical decreases" listed in column 5 of Table XI correspond to the disappearance of the individual components as concluded from the specific analytical methods by which they were determined. This means, for instance: for carbohydrates, the loss of reducing power; for pectins, the loss of the capacity to develop carbon dioxide under the conditions of the Lefèvre-Tollens method; for polyphenols, the loss of reducing power of those substances precipitated with lead acetate; for resins, the loss of petroleum ether or ether-extractable substances; for organic acids, the loss of titratable acidity in an ether extract made from acidified tobacco powder; and for nitrogen compounds, the loss of distillable ammonia and distillable alkaloids, etc. In the preceding discussion, it was emphasized that these "analytical losses" must not be misinterpreted as "total losses from the leaves," a point often ignored in the literature. To illustrate this point, columns 6 and 7 list the "real losses" from the leaves, and columns 8 and 9 the types and quantities of substances that arise in the fermenting leaves *via* chemical transformation of some of the analytically disappearing leaf components. The sum of the "real losses" must equal the observed total loss of dry weight.

The values for the "analytical decreases" depend on the specific analytical procedures employed. Thus, a large decrease of polyphenols concluded from an observed large loss of reducing power in the polyphenol fraction may be contradicted by an analytical method based on measurements of the tanning action (*e.g.*, gelatin coagulation) of the polyphenols. Whereas the former method registers the unoxidized phenolic hydroxyl groups only, the latter responds also to the quinoid substances formed by oxidation of the phenolic groups. Only thorough and critical investigations of every special sector of

the leaf components will finally clarify the complex chemical changes occurring in the leaf tissues.

This concludes our discussion of the main chemical effects of the fermentation of cigar leaf tobacco. Despite the elucidation of some of these effects, much more work will be required before we shall be able to recognize the essential reactions of certain leaf components—for instance, the chemical changes of the resins and volatile oils.

D. AGING OF FLUE-CURED CIGARETTE TOBACCO

The techniques used for the aging of flue-cured cigarette tobaccos, and the chemical changes which occur during this process, are in many respects basically different from the sweat of cigar filler tobacco discussed above (3-5,33-40,45,68). The various other kinds of tobacco fermentation lie between these two extreme types. The following report on the presently known facts about the aging process of flue-cured tobacco will therefore serve to stake out the limits of the entire field of tobacco fermentation.

1. Composition Prior to Aging

Starting with harvest time, the leaves of typical flue-cured cigarette tobaccos have a chemical composition that deviates considerably from cigar tobacco leaves. Tables I and II on pages 313 and 315 in Part I demonstrate this basic difference. The contrast between the two types becomes even more marked with the further processing of the leaves. In shed curing of the flue-cured tobacco types, very high final temperatures (up to 93°C.) are employed which inactivate most of the leaf enzymes, "freezing" the composition of the leaves at this moment. Another factor that paralyzes most of the chemical activity in flue-cured tobacco is the relatively low moisture content of the leaves (10-15%) at the completion of their shed curing. However, certain changes occur in shed curing prior to inactivation of the leaf enzymes, such as hydrolysis of proteins to amino acids and to ammonia, hydrolysis of polysaccharides to simple sugars, and an initial attack on the pectins and related materials of the cell walls. In conjunction with the high temperatures at the end of the curing, this action on the cell walls frees some of the polyphenolic compounds in the leaves, an effect demonstrated by Roberts (Sect. IIB2d2) by showing the oxygen uptake of flue-cured leaves if tested in an aqueous suspension. However, because of the low moisture of the leaves, the

larger part of the polyphenolic substances remains unoxidized in the normally processed leaves of flue-cured types.

2. *Technique of Aging*

Before aging, the flue-cured tobacco is usually stored for a period from two weeks to four months, at which time it has a moisture content of 15 to 25%. Immediately before aging, the leaves are "redried" in special machines and reconditioned to a well defined moisture content which lies below the limit above which spoilage by molding would become dangerous. According to Dixon *et al.* (45), the tobacco temperature is raised in the redrying process to as high as 82° C. and the moisture content drops simultaneously from about 18 to about 6%. The redried tobacco is permitted to reabsorb moisture under controlled conditions until its humidity content is 9 to 10%. In this state, it is packed into hogsheads (see Table II), and stored at the ambient temperatures of 3° to 30°C. (seasonal temperatures) for two to three years. In contrast to the repeated interruptions employed in the sweat of cigar leaf tobacco which provide new supplies of oxygen to the leaves, the aging of flue-cured types is not disturbed at all over its entire duration. Furthermore, both processes differ conspicuously in the water contents of the tobacco (up to 50% for cigar filler leaf, about 10% for flue-cured), and in the temperature and humidity of the surrounding atmosphere (about 50°C. and 60% relative humidity for cigar filler leaf, and up to 30°C. and "natural" relative humidity for flue-cured).

The much milder conditions imposed on the flue-cured tobacco, and its previous treatment, result in a correspondingly weaker response of the leaves compared with the high activity of sweating cigar leaf tobacco. No temperature rises are observed, carbon dioxide evolution remains at a very low level, and the total weight loss stays below 1 to 2%. On the other hand, the odor of the tobacco progressively changes into a more pleasant aroma, its water-holding capacity decreases from 9 to 4% moisture content (at 39°C., 50% relative humidity), and its color changes from a bright to a dull yellow. These are all signs for a restrained but nevertheless beneficial effect of the aging process on the flue-cured leaves.

3. Analytical Results

Only one extensive* analytical study of the aging process of flue-cured tobacco† has been published by Dixon, Darkis, Wolf, Hall, Jones and Gross (45). In this investigation, a few characteristic leaf components were determined in six monthly intervals over an aging period of thirty months. Six types of flue-cured cigarette tobacco, and of every type representatives of crops of three different years, were analyzed. No indications were found for striking deviations of any single type or crop from the general trend of chemical changes.

The tobacco samples investigated by Dixon *et al.* in this study of the aging process had a composition which corresponded, within the limits of the usual variations, to the average values listed in Table XII.

That is, as far as the reported analytical data go. Table XI on page 364 in Part I of this survey contains slightly different data for the composition of flue-cured tobacco types. The values of both tables lie within the limits of common variations.

Of the many leaf components, only those listed in Table XIII were analyzed in this investigation by Dixon and co-workers.

From these analytical data, it can easily be seen that the chemical effects caused by the aging of flue-cured tobacco are considerably smaller than the changes observed for sweating cigar tobaccos. These first analytical data on the aging process cover only a few selected leaf components, and no comprehensive picture of the over-all changes during aging can be developed from them without additional analytical determinations. Nevertheless, they prove to be of considerable value because they permit us to arrive at certain general conclusions about the chemical aspects of the aging process.

(a) **Changes of Carbohydrates and of "nonvolatile Acids."** The largest analytical change observed by Dixon *et al.* is that of the "total sugars." Another conspicuous effect is the considerable increase of the water content of the leaves during the aging process. Since the aged tobacco has a very low water-holding capacity (about

* Some data on Netherland Indies flue-cured cigarette tobacco are reported by Nijholt (155).

† More data are available on the aging of *air-cured* cigarette leaf (see Table XII). However, these investigations have been made on a large number of tobacco types grown under different conditions. It would be difficult, if not impossible, to coordinate these data in a sensible pattern.

TABLE XII
 FLUE-CURED CIGARETTE TOBACCO BEFORE AGING—AVERAGE COMPOSITION (ALL VALUES LISTED IN PER CENT OF TOBACCO DRY WEIGHT)

Main classes of leaf components	Subclasses of leaf components, individual composition			
	Carbohydrates	Nitrogenous compounds	Ash constituents	Nonvolatile organic acids
Total carbohydrate hydrates...	11.0	Protein N..... 0.95	K ₂ O..... 2.9	Citric acid... 0.6
Hemicellulose (pentosans)...	7.8	α-Amino..... 0.12	CaO..... 4.4	Malic acid... 10.1
Pectins*..... 10.7		Nicotine..... 0.60	MgO..... 0.9	Oxalic acid... 1.0
Cellulose*..... 9.0		Nitrate*..... 18.8	Fe ₂ O ₃ + Al ₂ O ₃ ... 0.3	Total..... 11.7
Lignin*..... 3.5		Ammonia and Amide*..... 0.27	SiO ₂ 1.8	
Polyphenols... 2.0		Unknown water-sol. N 0.11	Cl..... 0.5	Resins
Total resins... 9.8		Total N..... 2.09	SO ₄ 1.6	Petrol. ether
Nonvolatile organic acids... 11.7		Including water-sol. N..... 1.14	P ₂ O ₅ 0.2	sol..... 6.4
Total ash..... 13.2		Total..... 27.4	Total..... 13.2	Ethyl ether sol..... 3.4
				Total..... 9.8†

* The numerical values for all the components of this table not marked with an asterisk are averages compiled from analytical data obtained with flue-cured tobacco; data were compiled from the following references: 3-5, 16, 38-40, 45, 68, 69, 73, 210, 232, 247, 248. The values of the components marked with an asterisk had to be estimated by using analytical values obtained for air-cured cigarette tobaccos because corresponding values for flue-cured types were not listed in the accessible literature (7, 15, 17, 20, 24, 27, 41, 68, 69, 152, 167, 172, 202, 203, 225-227).

† Includes 5.9% resin acids, 1.0% waxes, and 0.3% volatile oils.

TABLE XIII
CHANGES OF SOME COMPONENTS IN LEAVES OF FLUE-CURED CIGARETTE TOBACCO OVER THIRTY MONTHS OF AGING^a

Type of leaf component	B.A. values in % B.A. dry wt.			A.A. values in % A.A. dry wt.			A.A. values in % B.A. dry wt.			Changes during aging	
	Of compts. proper	In terms of N	In milli-equiv./g. tobacco	Of compts. proper	In terms of N	In milli-equiv./g. tobacco	Of compts. proper	In terms of N	In milli-equiv./g. tobacco	In terms of % B.A. dry compts.	In terms of % tobacco
Total sugars.....	18.99	17.54	17.28	-1.71	..
Nonvol. org. acids ^b	8.61 ^c	1.32	1.26	8.18 ^c	8.06 ^c	1.24	..	-0.55 ^c	-0.08
Total N.....	..	1.90	1.77	1.75
Water-sol. N.....	6.15	5.75	1.15	..	5.66	..	1.14	-0.49	..
α-Amino N.....	1.22	0.97	0.16	..	0.95	..	0.16	-0.27	..
Nicotine N.....	2.74	2.44	0.42	..	2.40	..	0.41	-0.34	..
Ammonia + amide	..	Not given	-0.02
N.....	..	5.25	4.80	4.80	-0.45
pH.....
Moisture.....	8.77	10.22	10.17	+1.40	..

^a B.A., before aging. A.A., after aging.
^b The determination of these acids is limited to those which are ether-soluble and not volatile with steam.
^c Values calculated from the data of Dixon *et al.* (milliequivalents) by using the average of 65 mg. for one milliequivalent of nonvolatile acid (citric, malic).

4% water content, in equilibrium with air of 50% relative humidity at 39°C.), this increase in water content is obviously not caused by any equilibration of the tobacco with the moisture of the air surrounding the hogshead. Therefore, the increase of water in the leaves must originate from the generation of "reaction water," resulting from chemical conversions within the leaves. The moderate temperatures of the tobacco, and the slowness of diffusion of gases and vapors through the walls of the hogshead, favor the retention of this reaction water within the bulk of the tightly packed tobacco.

If all the "analytically disappearing" carbohydrates were quantitatively oxidized to carbon dioxide and water, about 25 g. CO₂ and 10.2 g. H₂O would be obtained for every kilogram of tobacco. The latter value corresponds to 1.02% of newly formed moisture, and is fairly close to the observed increase of the tobacco moisture of 1.40%. Additional amounts of carbon dioxide (about 6 g./kg. tobacco) and of water (about 3 g./kg., or 0.3%) would originate from the "analytically disappearing" "nonvolatile organic acids" if they too were exhaustively oxidized during the aging period.

Although a respiratory combustion of the sugars and nonvolatile acids would thus explain the increased water content of the aged leaves, a complete oxidation of the analytically disappearing sugars and acids proves to be extremely unlikely, in view of further observations. The amount of tobacco stored in one hogshead, of some 450 kg. (see Table II), would generate the large amount of 10.3 to 12.6 kg. CO₂, as a result of the complete combustion of the carbohydrates and nonvolatile acids that disappear during the aging. This amount of carbon dioxide is equivalent to about 6500 liters of pure carbon dioxide, under the temperature and pressure conditions employed. Considering that the internal volume of the hogshead is about 1500 liters and its gas-filled volume about 890 liters, this implies that the quantities of carbon dioxide which would be evolved during aging would suffice to replace four to seven times the volume of the air within the hogshead. Even permitting for a considerable seepage of gas from and into the hogshead, a very high concentration of carbon dioxide would be built up under these conditions in its interior. There are, however, no indications whatsoever for such an effect. The carbon dioxide contents inside the hogshead were determined frequently by Dixon and co-workers during the first month of aging, and thereafter every month for one full year. The contents found

during the first months ranged between only 1 and 8 volume parts in 1000 and in the following year remained rather constant at the very low level of 6 volume parts in 10,000. Even at the highest concentrations, these carbon dioxide contents do not exceed a total amount of about 15 g. inside the hogshead. Considering that we derived a hypothetical average value of about 11,000 g. total carbon dioxide output (assuming a total oxidation of the sugars and non-volatile acids), this would mean that the gas content of the hogshead would require a complete turnover in the first month of aging—at least every hour, in order to keep the level of carbon dioxide concentration down to the low concentrations found analytically. This consequence of the total combustion mechanism is evidently absurd, and the hypothesis of a complete oxidative degradation of the sugars and nonvolatile acids has to be abandoned.

A second fact supports this conclusion, namely, the decrease of pH during the aging process. As we shall see, a removal of basic organic leaf components occurs only to a very small extent, if at all, during aging. Hence, the observed increase of acidity of the leaf tissues must originate from the formation of acidic substances in the leaves. The observed change of pH from about 5.3 to 4.8 can be estimated roughly to be caused by a 10% increase of acids in the leaf tissues. Since the initial acid content of the tobacco is about 1.3 milliequivalents per gram, an increase by some 0.10 to 0.16 milliequivalent would suffice to cause the observed decrease in pH . The amount of sugars which disappears "analytically" in aging, per gram of tobacco, is about 0.1 millimole of hexose. Production of about two molecules of acid, *via* the partial oxidation of one molecule of hexose, would therefore cover the requirement for newly formed acids. Dixon *et al.* reported a decrease of the "nonvolatile acidity," an observation which seems to contradict this conclusion. However, the acids determined and included in this term are limited to those organic acids which (*e.g.*, citric and malic acids) are soluble in ethyl ether and are furthermore nonvolatile at 100°C. with steam. It is clear that a large number of acids known to exist in tobacco, *e.g.*, oxalic,* pectic, and uric acids, and the lower volatile members of the fatty acid series (formic, acetic, propionic, butyric, valeric, etc.) will partly or completely remain undetermined by the analytical method used by Dixon *et al.*

* Volatile with steam according to Vickery and Pucher (221).

Hence, any increase of acids of these and related types would remain undetected as long as the analysis of acids is limited to the "nonvolatile acids." Definite increases of volatile acids, particularly of formic and acetic acids, have been reported for air-cured tobaccos, another indication that our conclusion may be justified concerning the formation of new types of acids from the disappearing sugars and nonvolatile acids.

A partial oxidation of the carbohydrates, or of the higher molecular hydroxy acids like citric and malic acids, to acids which are not ether-soluble or which are volatile, would yield quantities of reaction water smaller than the quantities obtained from a total oxidation of these compounds to carbon dioxide. The deficit will be some 40 to 60%, depending on the types of acids formed. However, since various additional leaf components, such as the resins, pectins, pentoses, and phenols, and their changes were not determined in the study of Dixon *et al.*, the source of reaction water is not necessarily limited to the sugars and nonvolatile acids. In fact, the considerable demethoxylation of pectins observed by other investigators in the aging of *air-cured* cigarette tobaccos, and the decrease of resins found for the same type, make it quite likely that these or similar conversions also occur in the aging of *flue-cured* types.

(b) Changes of Nitrogenous Compounds. For the nitrogenous compounds, the results of the investigation by Dixon and co-workers again yield no complete data, but valuable indications regarding the chemical changes of these compounds during the aging.

The loss of total nitrogen, amounting to 0.13% of the dry tobacco weight, is about twice as large as the loss determined by Nijholt for the aging of a Netherland Indies *flue-cured* cigarette tobacco. Whereas the loss of total nitrogen by sweating cigar tobacco can be attributed to increased alkalinity of the leaf tissues and to the resulting liberation of ammonia and of nicotine from the leaves, similar reasoning is not very convincing for *flue-cured* tobacco, which becomes progressively more acidic during aging and which therefore presents an increasingly less favorable medium for the release of basic constituents.

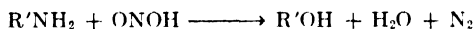
Concerning evaporation losses, it should not be overlooked that *flue-cured* tobacco, immediately before the aging period, is subjected to the redrying process in which temperatures of about 80°C. are reached. According to Dixon *et al.*,

the tobacco mass, just after its packing into the hogshead, may retain a temperature as high as 45°C. for some 10 to 12 hours. Kingsbury, Mindler, and Gilwood (110) report that flue-cured cigarette tobacco that initially contained 2 to 3% nicotine lost about 0.18% per tobacco dry weight of nicotine or 0.031% of nicotine nitrogen in the redrying operation. Evidently alkaloids can evaporate at 80°C. in this order of magnitude even from a medium of an average pH of 5. However, the losses that may occur during redrying are not included in the nicotine nitrogen loss of 0.06%* reported by Dixon and co-workers, since these investigators sampled their leaves for the pre-aging analyses after completion of the redrying operation. In view of the much lower temperatures through the aging period and of the increasing acidity of the tobacco, it thus appears extremely unlikely that the observed analytical nicotine decrease during aging can be entirely explained by evaporation of the alkaloid from the tissues.

By the same reasoning, it hardly appears possible that volatilization of ammonia, or of organic bases from the leaves, would amount to as much as 0.13%, *i.e.*, to the loss of total nitrogen of flue-cured tobacco reported by Dixon *et al.* Any satisfactory explanation of the loss of total nitrogen, therefore, must be based on an alternative mechanism.

It is conceivable that some volatile nitrogenous compounds which may form in the leaves are only weakly basic, as, *e.g.*, pyridyl ethyl ketone, a compound found in tobacco smoke (237,238). However, the amounts of substances of this type, if formed at all, appear to be by far too small to account for the total nitrogen losses.

An evolution of nitrogen in elementary form has been found to occur in the green leaves of tobacco and of other plants (43,88,137, 159,160,224). The authors who investigated this effect ascribed it to the presence of nitrites and amino compounds in the tissues, which react in an acidic medium according to the well known scheme:



Conditions for the performance of this reaction are: an acidic medium, the presence of compounds with primary amino groups (preferably amino acids), and the presence of nitrites or of a combination of nitrates and reducing substances (such as reducing sugars). These conditions prevail in the leaves of flue-cured tobacco with the one limitation that the quantities of nitrates contained in the tissues are quite small as far as can be judged from the very few determinations of nitrate nitrogen made for this tobacco type. If we accept the value of 0.04% for nitrate nitrogen from Table XII, the largest pos-

* Nijholt (155) reports a nicotine nitrogen loss of 0.02% after aging, but this figure is not very reliable because different batches of tobacco were sampled for the pre-aging and after-aging analyses.

sible quantity of elementary nitrogen that could be produced by the nitrite-amino reaction would amount to 0.08%. Allowing for the very modest evaporation of 0.02% ammonia plus amide nitrogen, which equals the value estimated by Dixon for the decrease of these components in aging, and for an evaporation of as little as 0.01% alkaloid nitrogen, we derive for the total loss of nitrogen the figure of 0.11%, close to the determined average loss of 0.13%. This hypothetical interpretation of the analytically observed changes of nitrogenous compounds still does not explain the observed disappearance of an additional 0.05% nicotine nitrogen (or of 0.29% nicotine). It would be desirable to investigate aged flue-cured tobacco by means of the methods developed in the field of cigar tobaccos for the discovery and determination of alkaloid transformation products. Only thus can dependable conclusions be reached as to the causes for the total observed nicotine decrease. The fate of the analytically disappearing α -amino nitrogen would have to be elucidated by a similar detailed investigation. If the amino nitrogen has, in fact, reacted with reduced nitrates to form elementary nitrogen, its recovery, even in a changed form would, of course, be impossible. If, however, part or all of the disappearing α -amino nitrogen has condensed with other leaf components, a reasonable chance would exist for either identifying the newly formed compounds or for regenerating from them the α -amino nitrogen by hydrolysis, reduction, or a combination of both. Dixon and co-workers suggest the possibility that a reaction takes place in aging between amino acids and sugars, yielding highly colored aromatic products (melanoids) (1,136,184). Various authors have studied this type of reaction and Dixon *et al.* point to the coloration of the condensation products and to their odor as indications that similar substances may be formed in the leaves during aging. It may well be that condensations of this kind occur in the leaf tissues. In addition, a formation of complexes between amino compounds and polyphenols should also be considered and tested, as an alternative possibility to condensation reactions involving amino nitrogen groups.

A more complete picture of the aging process would require many further studies including investigations of the changes of the pectins, the polyphenols, and particularly the resinous leaf components. It can be expected that a detailed identification of these substances in flue-cured leaves will by no means be easier or less complicated than in cigar tobaccos, but it appears equally certain that any success in

augmenting our knowledge of these leaf components will be an important step forward in understanding the chemical background of the processing of flue-cured tobacco.

IV. Hypotheses Concerning the Causative Agents of Tobacco Fermentation

A. THE PROBLEM

This survey would be incomplete without a section which deals with the numerous discussions of the agents causing chemical transformations in fermenting tobacco leaves. These discussions have centered around the question: Are bacteria necessary for the fermentation of tobacco, or are the native enzymes of the leaves sufficient to sustain this process, or, finally, can the conversions in the tobacco leaves be explained by "purely chemical" reactions?

As is common with arguments that cannot be clearly and convincingly decided either way, the dispute among the protagonists of the bacterial, enzymic, and chemical hypotheses has been fought incessantly, often flaring up into heated debates.

The ideas concerning the causative agents of tobacco fermentation were strongly influenced by the gradual growth of the general concepts in chemistry and biochemistry during the last eighty years. Thus, a short historic survey may serve best in representing the development of the hypotheses on the nature of tobacco fermentation.

B. THE DEVELOPMENT OF VARIOUS HYPOTHESES

1. *First Period: 1858-1900*

In the first period, the ideas concerning the nature of tobacco fermentation had as their sole source observations made on the bulk fermentation of cigar tobacco types, including the intensive sweat process for snuff tobaccos. The aging of cigarette tobacco, as practiced today, was still unknown at that time.

Koller (119), in 1858, pointed out that the phenomena shown by bulk sweating tobacco resemble those of the alcoholic fermentation*

* Initially, the word "fermentation" was used to signify a gentle bubbling or "boiling" condition, and the term was applied when the only known reaction of this kind was the production of wine, during which carbon dioxide is liberated in the form of gas bubbles. After Gay-Lussac studied the process, the meaning of the term was changed to signify the breakdown of sugar into alcohol and carbon dioxide. Since Pasteur's investigation as to the *causes*, the word became associated with microorganisms and still later with enzymes (168).

in some respects. In following this concept, Koller was the first of the investigators who attempted to intensify the sweat of tobacco leaves by the addition of yeast.

In 1867, Nessler (147) in Germany and, in 1868, Schlösing in France drew attention to similarities between the bulk fermentation of tobacco and the self-heating of other vegetable materials stored in tightly packed masses in the presence of moisture. These processes have in common the spontaneous rise of temperature, the generation of carbon dioxide, the development of characteristic odors, and changes in color of the treated material.

Before and during this period, J. Liebig had had his well known controversies with Berzelius and later with Pasteur in regard to the intrinsic nature of catalytic and fermentative reactions. In these debates, Liebig opposed sharply any assumption of specific "catalytic and fermentative forces," and proposed purely chemical and mechanistic interpretations of numerous catalytic and biochemical conversions. It was obviously under the influence of Liebig's authority that both Nessler and Schlösing interpreted tobacco fermentation as a "simple and regular process of chemical oxidation." That "ferments" may also contribute to this process was conceded implicitly by Schlösing's statement that the chemical oxidation of tobacco takes place, given proper conditions, "even in the absence of ferments."

In the meantime, starting in 1854, Pasteur laid the groundwork of modern bacteriology. As a result of his famous investigations, in the period from 1870 to 1880, the microbial nature of the lactic acid fermentation, of the alcoholic fermentation, and of many other processes in materials of vegetable or animal origin became generally accepted. The influence of these new discoveries was promptly reflected in the contemporary speculations on the nature of the tobacco fermentation.

Pointing to the bacterial nature of both, Fesca and Imai (51) compared the sweat of tobacco with the acidic fermentation of feed in the ensilage process, and Pinat and Grouvelle (162) pointed to the bacterial decomposition of manure as an analogy. Hunting for microorganisms, various investigators were soon able to show the presence of large numbers of bacteria and fungi on tobacco leaves. We mention Suchsland (1891) (208), Miciol (1891) (140), Dávalos (1892) (42), Behrens (1894,1896) (12,13), Koning (1897) (120), Vernhout (1899) (216), and König (1899) (116). It would be of little value to cite here the numbers of microorganisms per gram of tobacco observed by these authors, or to enumerate the types and strains of

microorganisms described by them because all this early work was still done with primitive methods. Partly, these authors claimed that fermentation was exclusively caused by the activities of microorganisms. Suchsland, who is characteristic of men of this attitude, recommended the inoculation of inferior tobacco types with microorganisms obtained from highly aromatic types such as Havana tobacco, with the purpose of thus producing a highly improved product. Efforts along this line were, however, without any success and have remained so up to the present time.

Other investigators dealt in a more critical way with the now firmly established fact that large numbers of microorganisms are present on fermenting tobacco leaves. By means of ingeniously planned experiments, Schlösing (187-189) investigated the influence of bacteria, including cocci, and of fungi on the bulk fermentation of snuff tobacco. Working with sterilized and with unsterilized leaves, he determined the carbon dioxide evolution from the bulks. His results implied that at temperatures below 40° to 50°C. the presence of microorganisms is necessary to initiate fermentation (*viz.*, the generation of carbon dioxide), whereas at higher temperatures, particularly at 70° and 80°C., fermentation proceeds smoothly and rapidly, even in the absence of microorganisms or *ferments organisés* (the term used by Schlösing).

Just as the term fermentation, the term "ferments" underwent changes in its meaning. In Schlösing's time, "organized ferments" meant the microorganisms proper, whereas the term "unorganized ferments" was applied, in a rather vague way, to the "active principle" believed to be contained in the microorganisms.

Since the bulk fermentation of tobacco for snuff production was commonly carried out at an average tobacco temperature above 40°C., Schlösing attributes to the bacteria merely the function of an initial generation of heat, after which their participation becomes insignificant. It is interesting to note that the investigations of Obalko (156) (see Sect. IIIC2g) carried out some fifty years after Schlösing, with other tobacco types and with other methods for detecting chemical activity of the leaves, led to corresponding conclusions.

Similar to Schlösing's cautious attitude toward the "bacterial hypothesis" was that of Behrens (12,13). This author, although acknowledging the possibility of microbial activity—particularly that of anaerobic bacteria—in fermenting tobacco bulks, nevertheless con-

sidered some of the conversions in the leaves as purely chemical effects independent of the presence of bacteria. In view of his analytical results (see Table VIII) and of qualitative signs, Behrens compared tobacco fermentation to the ensilage process of "brown hay."

2. Second Period: 1901-1933

Pasteur had tenaciously upheld the opinion that the chemical activities exerted by bacteria and fungi are exclusive results of the life process of these microorganisms. In 1897, Buchner (30) succeeded in obtaining ~~from~~ yeasts, and later from a number of other microorganisms, their "active principle" by disrupting the organisms and extracting some of the agents which we know today under the name of enzymes. It was soon recognized that the enzymes, although almost without exception inactivated by heating to temperatures between 40° and 110°C. are basically nothing else than chemical substances of a highly complicated structure which include as one main component a specific protein (63). The fact that the enzymes or "unformed" ferments (a synonym for "unorganized" ferments) are invariably found in living materials or in residues of living materials became clear, in view of their relationship to the proteins. The important conclusion from Buchner's discovery was that a content of enzymes is by no means an exclusive property of living microorganisms, but that they are present in form of hundreds of different types and specificities in almost all materials derived from plants or animals.

The new era in pure and applied biochemistry which started with the discovery of these biocatalysts was bound to influence the ideas concerning the nature of tobacco fermentation. In a series of papers published from 1899 to 1901, Loew (135) developed an "enzymic theory" of the chemical conversions in tobacco leaves. Using the methods available at that time, Loew proved the existence of an oxidase, a peroxidase, and of catalase in the leaf tissues of tobacco. These enzymes, easily recognizable through their participation in certain typical conversions, were found by Loew in green as well as in dried and fermented tobacco leaves. Pointing to the presence of these biocatalysts in the tobacco plant as the agents which cause the oxidative conversions during the fermentation, Loew turned sharply against the bacterial hypothesis as an unnecessary and unproved assumption. He backed his argument by the opinion that any effect

of the microorganisms on chemical conversions in the leaves could be ruled out because their numbers were insufficient, because the moisture content of the tobacco was too low for any appreciable microbial activity, and because the entire chemical composition of the leaves was unfavorable for the development of bacteria and fungi.

The years after 1900 brought the rapid development of enzyme chemistry and a number of publications on tobacco fermentation in which the significance of the *native leaf enzymes* for the various phases of processing was emphasized.

In two papers (97,98), H. Jensen (1908,1915) reported studies of the fermentation of Netherland Indies tobacco types in which he applied, just as did Schlösing before him, various methods for sterilizing the tobacco prior to its fermentation. Experiments were carried out with leaves which had been pretreated with mercuric chloride, formaldehyde, and chloroform, or which had been subjected to a steam treatment at 90° to 100°C. for periods from ten minutes to two hours. The fermentative activity of the tobacco, after these sterilizations, was measured by Jensen by means of its capacity for oxygen absorption and carbon dioxide generation. In most cases, the leaves were found to be still active after these treatments. Jensen concluded from these results that microorganisms are essential for fermentation only under exceptional conditions, as in tobacco containing 20% moisture or more—for instance, in the sweat of snuff tobacco. As to the leaf enzymes, Jensen admitted their importance for “regular” fermentation at lower moisture levels. However, he favored the view that a “purely chemical” mechanism of the fermentation could also prevail under certain conditions. This last point was further emphasized in a paper (21) by Boekhout and deVries (1909), who, again, found an undiminished capacity of tobacco leaves for oxygen absorption and carbon dioxide generation after exposure of the leaves over a considerable length of time to a temperature of 100°C. Since bacteria and fungi are destroyed and since most of the leaf enzymes, too, are inactivated by such a treatment, the authors were led to postulate a “chemical mechanism” for fermentation which, in their opinion, is controlled by inorganic catalysts present in the leaves. Similar results were reported (34) by Cohen (1912), with the modification that the coexistence of both an enzymic and a chemical mechanism were postulated.

In 1917, Kolenev (118) reported experiments with fermented cigar

and cigarette tobaccos in which the changes of bacterial flora on the leaves were observed parallel with the progress of fermentation. With all the tobaccos investigated, the initial numbers of microorganisms—occasionally as high as 2.5×10^6 per gram of tobacco—decreased rapidly during fermentation. Cigar tobaccos proved to be sterile after eleven days of fermentation during which a maximum temperature of 63°C . had been reached, and similar results were obtained for cigarette tobaccos. Kolenev sees in these observations a strong argument against the bacterial hypothesis and a proof for the enzymic mechanism of fermentation. Fodor and Reifenberg (57), in 1927, obtained similar results, as did Jensen with tobacco extracts that had been sterilized. In view of their results, Fodor and Reifenberg refuted the bacterial hypothesis. Smirnov (201,202) (1927, 1933), Jouravsky (106) (1929), and Kissling (112) (1925) expressed their opinion that bacteria contributed to the fermentation of tobacco, if at all, only under very specific conditions (relative humidity exceeding 70–75%, tobacco moisture exceeding 20%) and that in all other cases the enzymic and chemical mechanism prevailed exclusively.

More detailed studies of the leaf enzymes, their heat stability, and their changes during processing of the leaves were carried out in 1912 by Vriens and Tijmstra (230), and also by Smirnov and other Russian authors. Similar investigations (8,19) were made on Hungarian tobaccos by Bodnár and Barta (1933). Generally, the enzymes of leaf extracts investigated by these authors (peroxidase, catalase, phenol oxidase, sucrase) decrease very considerably during the processing of tobacco leaves (8). Only for peptidase was an increase found as a result of the fermentation process. Bodnár and Barta (8,19) studied specifically the decrease of nicotine during the fermentation of Hungarian tobaccos and measured simultaneously the enzyme content of these samples. A fairly close parallel was found in this work between the catalase content of the leaves and the disappearance of nicotine.

In commenting on the results of all these enzyme studies, it is well to remember that the presence of enzymes in extracts made from tobacco leaves does not mean that these enzymes are necessarily derived from the leaf tissues only; there is always the possibility that they have been elaborated by microorganisms during the period of their active life and of their decay on the plant tissues.

In 1930, Neuberg and Kobel (149–151) reported studies on the

enzymes of the green tobacco leaf, on the influence of these enzymes on the metabolic changes in the leaf, and on the enzymic conversions that take place during the period of shed curing (see Part I, pages 366-377). Publications of this type helped to establish, around 1935, as an almost generally accepted view, the enzymic theory of tobacco fermentation. Typical for this acceptance are, *e.g.*, the discussions in the book (27) of Brückner (1936) and in the survey (18) of tobacco chemistry presented by Bodnár and Barta (1935).

However, the microbial hypothesis did not remain completely dormant during this period, in spite of the powerful attacks directed against it by Loew and in spite of the accumulating data on enzyme activity in tobacco leaves.

In 1913, Mosca (144) reported the isolation of many more bacteria types than previously found from tobacco leaves, and Schmidt (190), as well as Joergenser (100), both in 1925, described the microflora of tobacco and the successive development of various types of microorganisms as observed in the course of the fermentation process.

3. Third Period: 1935 up to the Present

In the last fifteen years, most investigations of the agents that cause the fermentation of tobacco have gained in depth, without leading to a reconciliation of the various hypotheses. Characteristic for several recent papers is a revival of the microbial hypothesis, whereas, on the other hand, studies of the aging process of flue-cured tobaccos led to results which seem to exclude a bacterial mechanism for this special type of tobacco processing.

A thorough study of the fermentation of cigar tobacco was made by Johnson (102) in 1934. The fermentative activities of samples of about 150 g. each of cigar leaf tobacco were measured by keeping these samples in Dewar flasks (this method had already been used by Jensen (98) in 1915) at a constant ambient temperature and registering the temperature increases (thermogenesis) in the samples over a period of several days. Parallel semiquantitative observations were made on the evolution of ammonia and carbon dioxide from the samples, on their odor, on the color of their aqueous extracts, and on the presence of catalase, peroxidase, bacteria, and fungi in the individual samples. Samples sterilized by sufficiently high temperatures (steaming for 45 min. at a temperature of about 80°C.) proved completely inactive in regard to thermogenesis or to any other sign of ferment-

tation. This result did not permit any decision on whether enzymes or bacteria are required for a normal fermentation because both agents could be inactivated by the sterilization procedure. The addition of porcelain-filtered extracts from unheated tobacco which contained peroxidase and other enzymes, but no microorganisms, failed to induce thermogenesis. However, Johnson did not consider this result as a convincing proof against the enzymic theory because the amounts of enzymes transferred to the sterilized samples may have been insufficient, or some enzyme or activators, being insoluble, may have been lacking in these aqueous "enzyme extracts." Three species of bacteria commonly occurring on tobacco failed, too, to induce thermogenic activity in preheated samples, but several fungi isolated from tobacco were very efficient in this respect, yielding results comparable to normal fermentation. In experiments with antiseptic pretreatments of the tobacco samples, chloroform, mercuric chloride, acetone, toluene, and β -naphthol checked thermogenesis almost completely; since these antiseptics destroy microbial activity, they may also cause the inactivation of certain enzymes, and again no definite conclusions appear to be warranted from these results. Silver nitrate diminished the fermentative activity of the tobacco samples to about one-half; since this agent was believed to prevent microbial activity without harming the action of enzymes, Johnson concluded finally that microorganisms, specifically fungi, may play a role in addition to the leaf enzymes in the fermentation of cigar leaf tobacco, although these organisms do not necessarily appear to be essential to the fermentation.

The results of Johnson are in many respects, particularly regarding the heat inactivation, contrary to the findings of Jensen—which illustrates the difficulties of obtaining decisive experimental evidence in this field. According to Johnson, the methods used by Jensen did not exclude erroneous results.

Another contribution to the question of bacterial activities can be seen in a paper (146) by Naghski, Beinhart, and Couch (1944), in which the fermentation of fire-cured tobacco types was investigated, together with determinations of nicotine and volatile phenols in the samples and with counts of the microorganisms contained in the various types, before and after their fermentation. Fire-cured types were selected for this investigation because this tobacco, having been shed-cured over open wood fires, contained considerable amounts of

phenols. The latter ought to diminish any bacterial activity on the leaves due to their antiseptic properties. There was, in fact, a correlation between the number of bacteria on the fire-cured samples and their content of volatile phenols, in the sense that phenol-rich samples had the lowest counts of microorganisms. However, the antiseptic action of the phenols disappeared gradually during storage of the tobacco, and rapidly during its fermentation, probably because of an autoxidation of the phenolic compounds. Concurrently, the bacterial counts increased during the processing of these samples, and micrococci were found as predominating organisms during the height of fermentation of the fire-cured types. These findings appear to be inconclusive regarding the importance of bacteria for the fermentation process, and no claim concerning any "theory of fermentation" was made by the authors. However, their results show how easily a bacterial flora can reappear on an almost completely sterilized tobacco sample, due to the exhaustion of antiseptic action and due to reinfestation.

Another interesting contribution is presented in a publication by Obabko (151) which has already been discussed briefly in Part I on pages 374 and 375. In connection with our present topic, Obabko's observations indicate that the water extractable polyphenol of Oriental cigarette tobaccos can be inactivated by heating the leaves in air, nitrogen, or a vacuum to temperatures above 40°C, preferably up to 75°.

Preheating the tobacco to still higher temperatures (up to 130°C.) created water-extractable substances that resembled the oxidase-containing leaf extracts in their capacity to take up oxygen. However, the substances extracted after a high temperature treatment from the leaves are, according to further observations by Obabko, not enzymes, but polyphenols which oxidize easily in an aqueous medium. It is interesting to correlate this liberation by high temperatures of easily oxidizable water-soluble phenolic compounds with Roberts' report on the appearance of polyphenols in flue-cured tobacco leaves during the temperature rise in the curing sheds. Very puzzling is the further observation by Obabko that, contrary to the behavior of the water-extractable oxidase, which is inactivated by the heating of the leaves, the tobacco leaves proper retain their capacity for oxygen uptake, carbon dioxide generation, methyl alcohol liberation, and nicotine decrease, regardless of any preheating prior to the beginning of

the fermentation. Possible explanations for this discrepancy between the capacity of the leaf extracts and of the leaves proper to absorb oxygen after a heat treatment have been discussed in Part I on page 375. Whether a microbial activity caused by a bacterial infestation of the heat-inactivated tobacco leaves has played any role in Obabko's experiments cannot be decided but is a possibility that must not be overlooked. No mention is made of this point in Obabko's paper.

In other publications by the Russian school (228,229), the view is upheld that complete exclusion of bacteria from tobacco does not deprive the leaves of their capacity to ferment and to undergo all the chemical changes which signify a satisfactory fermentation.

Three investigations made in different laboratories can be classified as a "revival of the bacterial theory." The contributions of Giovannozzi (72) as well as of Reid, McKinstry, and Haley (174-176) present essentially detailed and methodically improved bacteriological studies of the microflora on tobacco leaves.

Giovannozzi (72) developed special staining and culture methods for counting and identifying the microorganisms obtained from tobacco leaves. The microflora of tobacco leaves before, during, and after fermentation were studied by this author and the results published in several papers. The numbers found per gram of dry tobacco weight are considerably larger than the numbers determined by earlier investigators. As an average, 2×10^6 organisms per gram of tobacco were reported by Giovannozzi for unfermented leaves, and 5×10^8 to 5×10^9 organisms per gram at the height of the fermentation. One reason for these higher counts is Giovannozzi's recognition of the fact that the microorganisms penetrate from the leaf surfaces into the interior of the leaves, and that, for quantitative counts, it is necessary to grind the tobacco to a fine powder before water suspensions are made from which the microorganisms are plated out. According to the same author, *blastomyces* types predominate on the leaves, in the earlier stage of the fermentation, but decrease to zero parallel with the increasing alkalinity of the leaf tissues. In their place, *schizomyces* types develop on and in the leaves. In the majority of the fermented samples, more cocci were found than bacilli and a special form of a spore-forming yeast of the type *Debaryomyces* was obtained from a fermented Kentucky tobacco.

Studies of a similar nature were carried out on a large amount of material by Reid, McKinstry, and Haley (138,174-176) in the years

1937 and 1938 with cigar tobaccos as the main subject, and bulk fermentation as the method of processing. According to these authors, the numbers of fungi in cured leaves varies from 2000 to 10,000 per gram and those of bacteria from 50,000 to 250,000. These numbers showed a large increase after wetting the leaves prior to fermentation. At this stage, the total numbers found were 3×10^6 to 5×10^8 per gram. A further rapid multiplication occurred in the course of fermentation. The highest numbers observed per gram of tobacco, at the height of the bulk sweat, were 1.5×10^{10} microorganisms. In the later stages of the sweat, the numbers decreased quite rapidly, but every process of "rebulking" resulted in a pronounced but transient increase of numbers. As to the types of microorganisms, Reid *et al.* identified, on the cured leaves yeast-like fungi which, however, were rapidly destroyed in the course of a satisfactory fermentation. Anaerobic, spore-forming bacteria of the *Bacillus subtilis-mesentericus vulgatus* group were the microbes that showed a rapid increase in number during the sweat of the leaves. Members of the *Bacillus megatherium* group failed to show any significant increase of numbers during the process. Cocci, resembling *Micrococcus candidans*, increased in numbers with the progress of the fermentation but at a less rapid rate than the members of the *B. subtilis-mesentericus vulgatus* group.

The extent of multiplication of these organisms depended on the quality of the leaves, the amount of moisture, and the temperature—in other words, on the same factors that control the efficiency of the fermentation process. Reid *et al.* observed, furthermore, a close parallel between the presence of catalase in the tobacco samples and their counts of microorganisms. Heat-inactivated leaves contained no catalase but showed an increasing amount of this enzyme as soon as they were inoculated with cultures of bacteria previously isolated from tobacco.

These results of the Italian and American authors leave no doubt about the fact that considerable numbers of bacteria can be found on and in tobacco leaves, and that the microorganisms can drastically increase during fermentation, at least in its initial phases. These large numbers are bound to produce some chemical changes in their substrate. Nevertheless, the findings do not decide the question, in the author's opinion, as to whether the presence of bacteria is the condition *sine qua non* for the initiation and upkeep of the fermentation process, or whether the existence and growth of the bacterial

flora must be regarded as a secondary effect. It is conceivable that fermentation of tobacco starts by way of enzymic or purely "chemical" factors, and that the progressing fermentation transforms the leaves into an increasingly favorable medium for the nutrition of bacteria, with the result that the rapid increase of microbes follows rather than causes the chemical conversions in the leaves.

An important step toward solving this ambiguity was made by C. Jensen and Parmele (96) in an investigation carried out in 1937. In a manner similar to that of Johnson (102), these investigators worked with samples of powdered cigar leaf of about 100 or 300 g., the tobacco being subjected, in glass vessels, to the moisture and temperature conditions of fermentation. The start and continuation of "fermentation" of these samples were observed at constant outside temperatures (34°C.) by measuring the evolution of carbon dioxide and ammonia, and determining the pH increase and the temperature rise. In agreement with the results obtained in most of the more recent investigations (with the exception of the results reported from Russian laboratories), Jensen and Parmele found a complete inactivation toward fermentation after the tobacco powders had been sterilized by a heat treatment (autoclaving at 15 lbs. pressure for 20 min.). In further agreement with the results of Johnson, it was found that aqueous extracts of equivalent amounts of tobacco which had been freed from bacteria by filtration through Berkefeld or Seitz filters did not instigate fermentation if added to heat-sterilized powders. The same types of extracts, if added without a previous filtration, initiated fermentation promptly, *i.e.*, they caused ammonia and carbon dioxide generation, pH change, and thermogenesis. Hence, certain agents which are retained by bacterial filters are required to produce chemical activity in samples of heat-sterilized tobacco powders. Since it was possible that these nonfiltrable agents contained, besides bacteria, high molecular enzymes as well, Jensen and Parmele ran another series of experiments in order to find out whether or not very small amounts of the unfiltered tobacco extracts were sufficient to instigate fermentation in large amounts of sterilized tobacco. If enzymes are the agents that start the chemical activity of sterilized powders, it was to be expected that small amounts of unfiltered extracts would, if added to large amounts of tobacco powder, produce a correspondingly weaker effect. If bacteria are the agents, no such effect was to be expected because of the capacity of the microbes to multiply on a suitable sub-

strate. Extracts of only 5 g. tobacco, if added to 300 g. sterilized tobacco, after an incubation period of gradually increasing activity, produced the same temperature increase in forty-eight hours as that obtained with a sample of unsterilized tobacco. This is the result to be expected for a bacterial mechanism. Following this principle further, Jensen and Parmele made the following test. Sterilized tobacco that had been brought into fermentation by inoculation with an unsterilized extract yielded an extract that introduced fermentation in a second sterilized sample; a small amount of new extract made from this second sample instigated full fermentation in a third sample; and so on. A series of six successive transfers of small inoculates was carried out with positive results. The authors appear fully justified in their conclusion that these experiments cannot be explained by the action of plant enzymes, but only by a bacterial effect, for the fermentation of small samples of powdered cigar tobacco which they studied.

Bacterial counts made by Jensen and Parmele with cigar tobacco leaves revealed, in accordance with the results of Giovannozzi and of Reid *et al.*, that the number of microbes on cured leaves is relatively low, increases rapidly after the curing operation, and reaches a distinct maximum (about 1×10^8 per gram) around the fifth day of the bulk sweat, after which a slow decrease sets in. Fully fermented leaves contained only a small fraction (less than 1%) of the number of microorganisms present at the peak of fermentation.

Parallel to the counts, tests were made for the presence of catalase, peroxidase, and indophenol oxidase. In the cured leaves, the first of these enzymes was present only in traces and the second and third were completely absent. However, all three enzymes appeared in the leaves in easily detectable amounts during bulk sweat and remained present throughout the sweat process, even though the bacterial counts diminished rapidly toward the end of sweat. In a similar way, the temperature rise of the tobacco continued and even increased over the entire duration (thirty days) of the bulk sweat, in spite of the decrease of microorganisms after the fifth day. These observations indicate, according to Jensen and Parmele, that the enzymes appearing in the fermenting leaves are of bacterial, rather than of plant, origin and that these enzymes are capable of producing a steady rise in bulk temperature, even after the numbers of bacterial cells themselves have started to decrease.

Three organisms occurred in significant numbers on the leaves studied by Jensen and Parmele: *Micrococcus bicolor* (80%), *Bacillus sphaericus* Neide (10%), and *Bacillus cereus* (8%), with four more species being present in relatively small amounts. With the progress of the fermentation, no changes were detected in the relative distribution of these species.

Inoculation of sterilized samples of powdered tobacco with bacteria including cocci obtained from pure cultures of the seven single species found on tobacco leaves resulted, for four of the seven, in thermogenesis, for six in carbon dioxide formation, and for a few in a weak evolution of ammonia. None of the single species produced effects as large as those observed with unsterilized tobacco, but a combination of four of the more active bacteria produced a total effect comparable in every respect to that of the unsterilized control if added to sterilized tobacco. Apparently, cooperation of various bacterial species is essential and results in a superadditive effect.

A recent publication of Demeter (44) confirms the results of the American authors in several respects. Sterilization of tobacco leaves in these experiments (45 min. at 80°C.) led to inactivation under the conditions of fermentation (80% relative air humidity, 45°C.). On unsterilized, normally fermenting leaves, a varied microflora was found (six species with forty-four types on German tobaccos) in numbers from 100,000 to 600,000 per gram, which increases up to 2×10^6 per gram in fermentation. Inoculation of sterilized leaves resulted, with some of the bacteria found on the leaves in very good fermentation, whereas others were without any observable influence, and others were even harmful. Of the single groups of bacteria found, mixtures of certain flavobacteria proved to act somewhat better than mixtures of spore formers, such as *Bacillus subtilis*. Tobacco extracts freed from microorganisms by filtration induced some fermentation, but this fermentation remained incomplete, even after twenty-two days. Different mixtures of bacteria caused different decreases of nicotine. Most efficient, in this report, were the flavobacteria but the enzyme-containing sterile extracts also were at least as active in producing a decrease of nicotine.

Demeter's final conclusion is that enzymes are not sufficient and bacteria necessary for the fermentation process.

While the findings of Jensen and Parmele constitute a convincing case for the necessity of bacterial activity for the type and specific conditions of fermentation they studied, almost equally convincing proof has been gathered *against* an important role of microorganisms for the aging of flue-cured cigarette tobaccos. In their study of the aging process, Dixon, Darkis, Wolf, Hall, Jones, and Gross (45) made successive counts of bacteria and fungi for all the cigarette tobacco

samples investigated at successive stages of the aging period. There were little differences from sample to sample. The numbers of microbes per gram of tobacco—about 80,000 bacteria and 1000 fungi at the start of aging—declined gradually, without significant fluctuations, reaching a value as low as 60 fungi and 600 bacteria per gram of tobacco after one year of aging. These numbers are negligible compared with those reported for cigar tobaccos. The species of organisms identified on the flue-cured leaves were those commonly found in soil and in air, and their presence on the leaves is readily explained, considering that the tobacco was packed by hand. Particularly significant is the rapid decline of these microorganisms during the aging period, contrary to the conspicuous increase observed by others on wetted cigar tobacco leaves in the initial phases of fermentation.

In a like manner, Dixon *et al.* found only weak indications for the presence of enzymes in their flue-cured tobacco samples. Diastase, catalase, and invertase either were absent or were present in very small amounts only, and proteolytic enzymes were completely missing. The small quantities of enzymes found in some of the samples appeared to decrease with the progress of aging.* The authors explain this lack of enzymes in the flue-cured leaves by the high temperature treatment to which the tobacco had been subjected. The general conclusion of Dixon and co-workers is that the contribution of both microorganisms and enzymes to the aging of flue-cured tobacco appears to be a minor one, and that aging is "in large measure a purely chemical process."

Recently another important study of the causative agents of tobacco fermentation was published by Grob (75a), who worked with a Swiss-grown cigarette tobacco type ("Mont Calme jaune") resembling a White Burley variety. As a criterion of fermentative activity, the oxygen uptake and carbon dioxide evolution of small leaf samples were quantitatively determined by means of a specially improved technique. The temperature and moisture of the leaf samples were varied over a wide range, and further measurements were made of the gas exchange of leaves which had been pretreated with high temperatures at various moisture levels.

* However, significant amounts of diastase, catalase, and invertase were observed in the leaves of *air-cured* cigarette tobaccos, for instance, sixteen times larger amounts of catalase than in the *flue-cured* leaves (45,203).

It may be remarked at this point that the mere uptake of oxygen and evolution of carbon dioxide by a tobacco sample does not necessarily indicate that this sample undergoes that *specific type of fermentation* which is desired by the trade. For instance, too vigorous a gas exchange, as is sometimes encountered with overmoistened leaves, yields an inferior (oversweated) end product.

In spite of this limitation regarding the immediate technical significance of gas exchange experiments, the results obtained by Grob are highly interesting. They are interpreted by this author in the sense that fermentative activity can be produced in the leaves in three different ways: (1) by the leaf enzymes proper, (2) by microorganisms, and (3) by easily autoxidizable substances formed in the leaf tissues by means of high temperatures.

Each of these three mechanisms can be the predominant one, depending on the conditions of the leaves during the activity tests, and on their previous treatment.

Mechanism 1 prevails at moisture contents of the leaves below about 28%. The oxygen uptake caused by the leaf enzymes, under these conditions, gradually declines during the test period, and, other conditions being equal, is favored by increasing moisture contents of the leaves.

The microbial mechanism, 2, is completely suppressed, with the specific tobacco type studied by Grob, for leaves containing less than 28% water. At higher moisture contents, microbial fermentation suddenly appears after a certain incubation period that is shorter the higher the leaf moisture. Contrary to process 1, microbial fermentation increases rapidly once it has set in, and can lead to very high rates of gas exchange. It can be suppressed selectively by sterilizing the leaves with AgNO_3 or NaF , which agents do not affect the type 1 fermentation.

Process 3 comes into action in leaves that have been subjected to temperatures ranging from 80°C. up, prior to the activity tests. Depending on the peak temperatures reached and the moisture conditions of the leaves during this pretreatment, mechanisms 1 and 2 can be partly or completely eliminated. The remaining capacity of the leaves for gas exchange is obviously due to chemical substances formed in the leaf tissues by the high temperatures. This purely chemical process, in contrast to enzymic and bacterial fermentation, is not poisoned by the addition of cyanides to the leaves. Inactivation of the leaf enzymes is just perceptible after a pretreatment (2 hours) of the tobacco at 55°C., whereas, after a pretreatment (2 hours) at 120°, inactivation is complete. The partial inactivation in the lower temperature range is enhanced by considerable moisture contents of the leaves during preheating.

The purely chemical autoxidations and oxidations, according to Grob, are caused by thermal decomposition products of leaf constituents which are adsorbed on solid leaf components. In model experiments, in which various organic compounds were subjected to heat treatment in the presence of adsorbents (for example, active carbon), considerable autoxidation of the adsorbed decomposition

products was observed. Grob concludes from these model experiments that the transformation of glucose into fructose and the adsorption of the latter on solid leaf particles is probably one of the main causes for the operation of mechanism 3.

The final conclusion drawn by Grob is that the industrial aging of cigarette tobaccos proceeds exclusively by way of the leaf enzyme mechanism, 1, and to some extent by means of the "chemical" mechanism, 3, and that no microbial fermentation is responsible for *this type of tobacco processing*, an opinion which had previously been expressed in the Swiss literature by Frey-Wyssling (63a).

The relationship of these findings of Grob with those of Obabko, and of Dixon *et al.*, who also studied the mechanism of aging of cigarette tobacco, is evident. Beyond this relationship, Grob's studies fill the gap between the mild aging of leaves with low moisture contents and the typical fermentation of cigar tobaccos for which the action of microorganisms appears to be one of the decisive factors.

C. THE PRESENT PICTURE

Even a superficial study of the claims and counterclaims of all these investigators makes it clear that it is futile to strive for one single and general theory of tobacco fermentation. As Dixon and co-workers state: "It appears unwarranted at present to consider that the predominating activity exhibited in any specific type of fermentation should be applicable to fermentation or aging in general." A number of authors have emphasized this point, but this has not prevented others from indulging again in generalizations that only distort the true picture.

1. *Relationship between the Various Mechanisms*

Actually, the gaps between the three hypotheses of the "purely chemical, enzymic, and microbial agents" have shrunk in the course of the years. The general denominator of the three views is the acknowledgment that *catalysts*, in the broadest sense of this term, are indispensable for the initiation and sustention of the manifold conversions that occur in tobacco leaves during their processing. These catalysts can be relatively simple and reasonably stable chemical substances, *e.g.*, compounds containing heavy metals. Or they can be simple organic substances, like polyphenols, quinones, and complexes formed from these and other compounds. There is the further important class, the enzymes—that is, organic, heat-sensitive cata-

lysts which contain proteins and characteristic prosthetic groups. One potential source of the latter is the tobacco leaf proper, whose metabolism during growth and maturity is largely controlled by its specific biocatalysts. Another potential source of enzymes is the microorganisms which develop, given favorable conditions, on and in the leaf tissues, and which are able to transform the organic matter of the leaves into other products. These bacterial enzymes may include highly specific types that differ widely in structure and specific activity from the native enzymes of the leaves.

All three types of catalysts can, in principle, contribute simultaneously to the total chemical effects; and it will largely depend on the type of tobacco, on its previous treatment, and on the conditions used for the fermentation or aging, which kind or kinds of catalysts will prevail and will predominantly control chemical conversions in the leaves.

From a practical point of view, the nature of the catalytic agents, for any given type of fermentation, appears to be of less importance than the physical structure and chemical composition of the tobacco itself. As a rule, leaves of the proper composition seem to contain *a priori* the catalysts that will initiate and support their fermentation, and they also seem to develop, spontaneously, a desirable microflora without any need of inoculations with special cultures. On the other hand "sweat-resistant" types or crops will generally retain this property, even if treated with various chemical compounds or enzymes, or bacterial cultures.

Addition of yeast, as a source of enzymes, to fermenting tobacco leaves produces a faster and larger temperature increase (74,207), but otherwise shows no improvement or acceleration of fermentation (58).

Nevertheless, it seems possible that leaves of a "sweat-resistant" type may be induced to a faster and more satisfactory fermentation by the addition of the "right type" of catalysts. In principle, such catalysts could be purely chemical, or enzymic, or bacterial in nature. So far, no conspicuous results along this line have been published; but in view of our lack of knowledge regarding the specific nature of the proper catalysts this does not necessarily imply that active sweat promoters cannot be found and used.

As to the role of the various agents in the *specific stages* of the tobacco processing, the native enzymes of the leaves obviously play the predominant role in the *shed-curing* phase (see Part I).

This appears to be a natural consequence of the short time interval between harvest and curing. Already at this point the flue-cured tobaccos deviate from all other types by receiving a singular treatment in the form of an exposure to high temperatures, which destroy the residual leaf enzymes and dry the tobacco to such an extent that the flue-cured leaves represent a poor substrate for any microorganism. On the other hand, the high temperatures of flue-curing favor the diffusion of intracellular leaf components such as phenolic compounds into the cytoplasm (see page 346), unlocking the latent possibilities in the tissues for chemical conversions that take their course in the subsequent stage of aging.

In the *air curing* of cigar and cigarette tobaccos, many of the plant enzymes remain in an active state and can unfold their activities when favored by the moisture content of the leaf tissues. Depending on the specific type and crop of tobacco, and on the moisture conditions of the tobacco in the curing sheds, development of microorganisms on the leaves will always be a possibility. It is known that, in the curing sheds, overmoistened leaves are often infested by undesirable molds and bacteria, and there are no reasons to exclude the possibility of a development also of "desirable" microorganisms, particularly in the later stages of curing.

Addition of water to the leaves, which usually precedes *fermentation* proper, will favor still further the growth of microbes on the leaves. However, the swelling of the wetted leaves will also enhance the possibilities for a mixture, by diffusion, of their chemical constituents and catalysts and, hence, for reactions between these constituents. Which of these factors will be the more important will depend primarily on the specific composition and on the water content of the leaves, and on the temperature, the supply of oxygen, the contact between the leaves, and a number of additional factors.

According to various authors, it appears that low moisture and high temperatures (above 40° to 45°C.) are inductive to "purely chemical reactions," whereas the opposite conditions are favorable for a rich development of microorganisms. In the experiments of Johnson and of Jensen and Parmele, the small tobacco samples used were kept at relatively low temperatures, and it seems understandable that the fermentation, or at least the start of the fermentation of these small samples, can, under these conditions, only be achieved by the induction of bacterial activity.

2. Presumable Mechanisms of Some Individual Conversions Occurring in Fermentation and Aging

(a) **General Considerations.** One point that appears worth while to test experimentally in fuller detail is the question of whether, among the manifold conversions in the tobacco leaves, some reactions are singular insofar as they require specific bacterial enzymes as indispensable catalysts, while other reactions in the leaf tissues can be enacted in various different ways. If it is permissible to speculate along this line, it appears likely that the combustion of carbohydrates and organic acids, as well as the oxidative deamination of amino acids, belongs to the conversions that can be set in motion by a number of diverse agents. The fact that a number of enzyme systems control these types of reactions in the living plant, the early start and uninterrupted continuation of these conversions through all the stages of the tobacco processing, and their occurrence in the aging of flue-cured leaves seems to indicate that different agents can initiate and control these processes. Depending on the special conditions, the agents may consist of enzymic systems or of catalysts of the phenolic or related types, or, finally, of microorganisms.

A purely chemical mechanism appears quite likely for the conversions within the sector of the resinous components, since these conversions can persist under rather dry conditions and at stages at which enzymes and microorganisms are practically absent from the leaves, as in the finishing phase of fermentation and during the aging process.

The breakdown of the cell walls, which involves, among other conversions, the split and oxidation of pectins and pentosans, seems to be typical for processes that may occur to a limited extent under the influence of the leaf enzymes, but that will be considerably furthered by a participation of the proper types of microorganisms.

The transformation of alkaloids is, compared with most of the other reactions, a "foreign" process insofar as there is no convincing proof for the existence and activity of a nicotine-transforming enzyme in the living tobacco leaf. This fact, the late emergence of the alkaloid transformation in the course of fermentation, and the relatively high stability of the nicotine molecule—all may point to the necessity of bacterial enzymes, at least for the initial step of the nicotine transformation (which probably consists in a dehydrogenation of the alkaloid).

(b) Separate Studies of the Mechanism of Single Components of

Fermentation. (1) *Purpose.* One way to recognize the working mechanism of tobacco fermentation more clearly is to study as separate units some of the typical conversions that occur in the leaves and to discover the conditions under which these reactions can be initiated. This method offers to the investigator a clearer and simpler way of eliminating the complications that arise from the simultaneous occurrence of a number of diverse reactions as they take place in the fermentation process. On the other hand, any results obtained from investigations of a single reaction ought to be considered as hints, rather than as evidence, in regard to the mechanism by which the same reaction types are actually performed in the fermenting tobacco leaves. Nevertheless, this kind of systematic and stepwise approach will certainly enrich our knowledge of the various possibilities that exist for the instigation and performance of the individual chemical acts of the fermentation process.

To a certain extent, such studies have already been made. We may mention here the studies of British authors on the oxidative deamination of amino acids (90,92) by means of complexes formed from polyphenols and amino compounds.

(2) *Application to Study of Nicotine Degradation.* As to the important special field of alkaloid transformation, various studies have been carried out of this type of reaction as it occurs in systems other than the tobacco leaf. Both the enzymic and bacterial decomposition of nicotine have been investigated, and it can be expected that other and more detailed investigations along these lines will help to give a clearer insight into the chemistry and catalytic background of the reaction as it occurs in the fermenting tobacco leaf.

Enzymic decomposition of nicotine: Of particular importance is the work of Larson, Haag and Finnegan (55,77,79,127,128,129,130,131), whose objective was to learn more about the chemical transformations correlated to the detoxication of nicotine in the animal body. Only a small fraction of nicotine administered to the dog is excreted as such in the urine; the remainder is transformed into unknown products by the action of an enzyme system located in the liver. Tests for the presence of nicotinic acid, nicotinuric acid, *N*-methyl pyridinium hydroxide, and trigonelline in the urine of dogs that had received considerable doses of nicotine showed that none of these compounds are present among the unknown excretion products (127). According to Larson and Haag and co-workers (130,131), cer-

tain analytical observations and measurements of the specific toxicities of various nicotine degradation products make likely that there are, among the nicotine metabolites formed in the animal body, compounds derived from nicotine by a cleavage of the pyrrolidine ring between the nitrogen and the 5 position—*e.g.*, 3-(1-methylamino-butyl)-pyridine.

Related to the work of Larson, Haag, and Finnegan are investigations of Werle and co-workers (238–242), who succeeded in demonstrating the enzymic oxidation of nicotine outside the animal body, in the presence of fresh liver tissue of rabbits and guinea pigs. This reaction requires the presence of oxygen. Carbon monoxide, hydrogen cyanide, and hydrogen sulfide retarded the oxidation of the alkaloid, which indicates that the nicotine-decomposing enzyme of the liver tissues contains iron or copper. A direct activation of oxygen seems to be involved, because replacement of oxygen by methylene blue stops the oxidation of the alkaloids.

Efforts by Werle to extract the nicotine-decomposing enzyme from the liver tissues met with no success; the enzyme appears to be cell-bound. In a more recent investigation, Werle (240) showed that nicotyrine is oxidized much faster in the presence of liver tissue than is nicotine. Possibly nicotyrine, which is a dehydrogenation product of nicotine (see Part I, page 344) is an intermediate formed during the oxidation of nicotine. As in the case of nicotine, the enzymic oxidation of nicotyrine is retarded by hydrocyanic acid, carbon monoxide, hydroxyquinoline, and pyrophosphate. In the presence of nicotyrine, the degradation of nicotine is completely suspended.

It may be of interest to point out here also an investigation (115) by Knox (1946) on the "quinine-oxidizing" enzyme of the animal liver. This enzyme brings about the oxidation of a number of heterocyclic nitrogen compounds to products in which the hydrogen in the α -position to the nitrogen atom is replaced by a hydroxy group. Among the compounds which are slowly oxidized by this enzyme are nicotinic acid and nicotine amide. Even if this enzyme, which is water-soluble, contrary to the liver enzyme studied by Werle, is not identical with Werle's nicotine-decomposing enzyme, it may be closely related to it.

These investigations prove the presence in the animal body, particularly in the liver, of enzymes that can bring about the oxidation of nicotine, and possibly of related tobacco alkaloids, to still unknown products. There is no convincing proof that enzymes of this or a similar active type are present as such in the tobacco leaf, and it ap-

pears possible as pointed out on page 428, that, for a fast performance of this specific transformation, an infestation is required of the fermenting leaves with certain types of microorganisms that possess in their own cells enzymes of the same or of a similarly effective type as are present in the animal liver.

Decomposition of nicotine by microorganisms: Some data have been gathered concerning the destruction of nicotine by microorganisms. Batham (10), in 1926, studied the nitrification in soils of various organic nitrogenous compounds, including nicotine. He found that the alkaloid is quite easily transformed to nitrate as the final product under the influence of certain soil bacteria which were not isolated.

In 1930, Faitelowitz (50) observed a considerable decrease of nicotine in tobacco extracts under conditions that made him conclude that this change was due to an infestation of the extract by microorganisms.

In 1935, Weber (233) described similar results obtained both with aqueous tobacco extracts and with thoroughly wetted leaves. Antiseptics stopped the disappearance of nicotine. This author was the first to achieve the same effect with pure nicotine in a synthetic nutrient medium for microorganisms and in the absence of tobacco or tobacco extracts. After inoculation of this medium with a mixture of bacteria obtained from tobacco extracts and which showed positive tests for oxidase, peroxidase, and catalase, the nicotine was transformed into unknown products. No pyridine was found as a decomposition product and the simultaneously appearing ammonia did not, according to Weber, originate from nicotine. Methylamine was formed and was believed to be a degradation product of the alkaloids.

In 1942, Bucherer and Enders (29) succeeded in measuring quantitatively the decomposition of nicotine in a synthetic nutrient medium by the action of single types of specific bacteria. Three different species of bacteria capable of using nicotine as a nutrient were obtained from different soils, dung, and manure by a "selective" method (28).

Essentially this method consists in starting with a haphazard mixture of microorganisms obtained from soils and related materials and in inoculating this mixture into a special nutrient medium which, besides the required mineral salts, contains as its only source of carbon and nitrogen the substance the microbial decomposition of which is being attempted. Of the microorganisms present, only those will survive and multiply that can use this substance as their nutrient. The process is repeated several times by means of transfers of the microbes to new media of the same composition under microscopic and chemical control. Finally, the desired type of bacteria is obtained in the form of a pure culture,

This method was used for breeding and isolating nicotine-decomposing bacteria from the soil samples.* Four different strains were obtained which destroyed this alkaloid at a considerable rate. The authors did not succeed in obtaining cell-free enzyme solutions from the nicotine-decomposing organisms, nor did they investigate, in detail, the nature of the transformation products.

In a qualitative way the formation of ammonia was observed. Some of the metabolites of nicotine did react with picric acid but differed from the alkaloid by not being distillable.

In a later publication, Enders and Glawe (47) studied the decomposition of nicotine in the tobacco leaf. They concluded from their results that bacteria cause the disappearance of the alkaloids to the largest extent (90%), even on the leaves, whereas the residual effect (10%), in their opinion, must be attributed to a native enzyme of the tobacco plant. These relative figures may not be completely correct and may also change from one leaf sample to the next. More detailed work would be required to clarify the point.

Recently, Enders and Windisch (48) studied yeasts in regard to their capacity to decompose nicotine. However, none of the various types of yeasts tested by these authors proved to be able to destroy the alkaloid, in contrast to the activity possessed by the soil bacteria studied by Enders and Bucherer.

The inefficiency of certain yeasts for nicotine decomposition may not exclude the possibility that certain multicellular fungi possess this capacity. Ivanov, Ivanova, and Larianova (89) reported that, under conditions of nitrogen starvation, *Aspergillus niger* can use nicotine as its nutrient; and Plotho (164) reports that *Proactinomyces*, a fungus found in soils, is capable of decomposing cyclic organic compounds, including pyridine, piperidine, and nicotine.

It appears possible that further studies along this line may bring additional progress particularly if, at the same time, the chemistry of the alkaloid degradation were to be studied more closely than heretofore.

The methods developed for the investigation of nicotine transformation in the fermenting tobacco leaf may eventually prove to be useful for these purposes, especially if applied in combination with

* The high activity of certain soil bacteria toward pyridine derivatives is also demonstrated by the fact that nicotinic acid is oxidized by the organism *Pseudomonas fluorescens* (121,154).

chromatographic methods, which promise to become a highly efficient tool in the field of tobacco alkaloids (166a).

V. Effect of Fermentation on Smoking Properties

While our present knowledge of the chemistry of tobacco fermentation is still far from complete, it nevertheless permits us to reach a few conclusions in regard to the improvement of the smoking qualities achieved by this process.

A successful fermentation seems to serve, primarily, the purpose of removing the substances which, in smoking, yield irritating and undesirable products either by decomposition or by dry distillation. Among others, the most irritating smoke components appear to be the alkaloids, and, to a lesser extent, the low molecular acids and products of an unknown composition that originate from the high temperature decomposition of proteins and amino acids, as well as from the pyrogenic breakdown of cellulose (52-54,76,78,81,95,126,170). Hydrocarbons, aldehydes, and volatile acids can be expected to arise from the carbohydrates of the leaves under the conditions of smoking. Acetylene (56) has been reported recently as a component of cigarette smoke; and aldehydes, including furfuraldehyde, have been observed by various authors. The amounts of these undesirable components in the smoke will depend on the extent to which they are further oxidized to carbon dioxide, in the high temperature zone of combustion. Such further high temperature oxidation will presumably again depend on the presence or absence of combustion catalysts. In this respect, the composition of the ash, particularly the presence of potassium and of oxides of heavy metals such as iron or manganese, may be of considerable importance for the composition of the smoke.

Thorough processing of tobacco, including its fermentation, will result in the disappearance of very considerable amounts of proteins, amino acids, and alkaloids, *i.e.*, of substances which create, by distillation or by pyrogenesis, undesirable smoke components (25,26). Partly, the fermentation products of these substances are volatile (as ammonia and possibly amines) and therefore have been removed from the finished tobacco. Partly, the amino acids and alkaloids have been transformed during fermentation into oxygenated derivatives which, in the smoking zone, will be more easily oxidized than their mother substances. An appreciable fraction of these "semioxidized" fermentation products may form oxygen-containing split-products such as

ketones (133,142,143,148,149,235-237) which, as a rule, possess aromatic rather than irritating properties. Of the oxidation products of nicotine, nicotinic acid will most likely sublime without considerable losses and exert no disagreeable effect on the smoke.

Aroma substances will be delivered into the smoke in the form of volatile oils and of cracking products that originate from the resinous components of the leaves. Another source of the aroma substances seems to consist of polyphenolic compounds, many of which will be decomposed in the high temperature zone to aromatic split-products. König and Dörr (117) have drawn attention to the agreeable and aromatic odors that appear when chlorogenic acid is subjected to high temperatures.

Very much more detailed work is required until the fermentation, even of one given type of tobacco, can be described satisfactorily in terms of its main chemical processes. The same holds for the catalytic mechanisms which are the driving and directing factors of the fermentation and of the aging process. Although it embraces a specialized field, future progress in the study of the harvested tobacco leaf may throw some light on other problems of plant chemistry.

References

1. Ambler, J. A., *Ind. Eng. Chem.*, **21**, 47 (1929).
2. Andreadis, T., *Biochem. Z.*, **211**, 378 (1929).
3. Askew, H. O., *New Zealand J. Sci. Technol.*, **29**, 144 (1947).
4. Askew, H. O., Blick, R. T. J., and Watson, J., *ibid.*, **29**, 5 (1947).
5. Askew, H. O., Blick, R. T. J., and Watson, J., *ibid.*, **29**, 158 (1947).
6. Baker, D., and Nelson, J., *J. Gen. Physiol.*, **26**, 269 (1943).
7. Balabukha-Poptzova, V., *Pub. Inst. Tobacco Invest. Krasnodar, U.S.S.R.* Bull. No. 59 (1929).
8. Barta, L., *Biochem. Z.*, **257**, 406 (1933).
9. Barta, L., and Marschek, Z., *Z. Untersuch. Lebensm.*, **76**, 358 (1938).
10. Batham, H. N., *Soil Sci.*, **24**, 187 (1927).
11. Beevers, H., and James, W. O., *Biochem. J.*, **43**, 636 (1948).
12. Behrens, J., *Landw. Vers. Sta.*, **43**, 291 (1894).
13. Behrens, J., *ibid.*, **46**, 163 (1895); **52**, 431 (1897); *Centr. Bakt.*, **2**, 514, 540 (1896); **7**, 1 (1901).
14. Beljaev, A. I., *Reports on Makhorka Invest.*, U.S.S.R. (1927).
15. Binder-Kortba, G., and Gärtner, K., *Z. Untersuch. Lebensm.*, **77**, 146 (1939).
16. Blick, R. T. J., *New Zealand J. Sci. Technol.*, **B25**, 53 (1943).
17. Bodnár, J., and Barta, L., *Biochem. Z.*, **247**, 218 (1932).
18. Bodnár, J., and Barta, L., *Ergeb. Enzymforsch.*, **4**, 274 (1935).
19. Bodnár, J., and Barta, L., *Biochem. Z.*, **265**, 386 (1933).
20. Bodnár, J., and Nagy, L., *Z. Untersuch. Lebensm.*, **76**, 115 (1938).
21. Beekhout, F. W. J., and de Vries, H., and Ott, J. J., *Centr. Bakt.*, **24**, 496 (1909).
22. Bonner, J., and Wildman, S. G., *Arch. Biochem.*, **10**, 497 (1946).

23. Boswell, J. G., *Ann. Bot.*, London, **9**, 55 (1945).
24. Bowling, J. D., and Brown, D. E., *U.S. Dept. Agr. Washington, Tech. Bull.*, **933** (1947).
25. Bradford, J. A., Harlan, W., and Hanmer, H. R., *Ind. Eng. Chem.*, **28**, 836 (1936).
26. Bradford, J. A., Harlow, E. S., Harlan, W. R., and Hanmer, H. R., *ibid.*, **29**, 45 (1937).
27. Brückner, H., *Biochemie des Tabaks*. Parey, Berlin, 1936.
28. Bucherer, H., U.S. Pat 2,230,130; applied 1938, granted 1941.
29. Bucherer, H., and Enders, C., *Biochem. Z.*, **310**, 222 (1942).
30. Buchner, E., *Ber.*, **30**, 117, 1100, 2668 (1897).
31. Capus, R., Leuillot, G., and Foëx, H., *Le Tabac*, **2**, 131 (1929).
32. Chodat, R., and Schweitzer, K., *Arch. sci. phys. et nat.*, **35**, 140 (1913).
33. Clagett, C. O., Tolbert, N. E., and Burris, R. H., *J. Biol. Chem.*, **178**, 977 (1949).
34. Cohen, N. H., *Mededeel. Proefsia. Vorstenland. Tabak*, **12**, 38 (1912).
35. Couch, J. F., Naghski, J., and Krewson, C. F., *Science*, **103**, 197 (1936).
36. Couch, J. F., and Krewson, C. F., *U.S. Dept. Agr. Eastern Regl. Research Lab. Report*, AIC-52 (1944).
37. Couch, J. F., Krewson, C. F., Naghski, J., and Copley, M. J., *ibid.*, AIC-115 (1946).
38. Darkis, F. R., Dixon, L. F., and Gross, P. M., *Ind. Eng. Chem.*, **27**, 1152 (1935).
39. Darkis, F. R., Dixon, L. F., Wolf, F. A., and Gross, P. M., *ibid.*, **28**, 1214 (1936).
40. Darkis, F. R., Dixon, L. F., Wolf, F. A., and Gross, P. M., *ibid.*, **29**, 1030 (1937).
41. Darkis, F. R., Hackney, E. J., and Gross, P. M., *ibid.*, **39**, 1631 (1947).
42. Dávalos, J. U., *Cronica Medico-Quirurg.*, *Habana*, No. 15; *Centr. Bakt.*, **13**, 390 (1893).
43. Dawson, R. F., *Arch. Biochem.*, **21**, 279 (1949).
44. Demeter, K. J., *Naturwiss. Rundschau*, **1948**, 171.
45. Dixon, L. F., Darkis, F. R., Wolf, F. A., Hall, J. A., Jones, E. P., and Gross, P. M., *Ind. Eng. Chem.*, **28**, 180 (1936).
46. Emmett, P. H., *Advances in Catalysis*, **1**, 65 (1948).
47. Enders, C., and Glawe, R., *Biochem. Z.*, **312**, 277 (1942).
48. Enders, C., and Windisch, S., *ibid.*, **318**, 54 (1944).
49. Evans, H. J., and Weeks, M. E., *Soil Sci. Soc. Am.*, **12**, 315 (1947).
50. Faitelowitz, A., *Biochem. Z.*, **224**, 460 (1930).
51. Fesca, M., and Imai, H., *Landw. Jahrb.*, **17**, 327 (1888).
52. Finnegan, J. K., Larson, P. S., and Haag, H. B., *Science*, **102**, 94 (1945).
53. Finnegan, J. K., Fordham, D., Larson, P. S., and Haag, H. B., *J. Pharm. Exptl. Therap.*, **89**, 115 (1947).
54. Finnegan, J. K., Larson, P. S., and Haag, H. B., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **65**, 200 (1947).
55. Finnegan, J. K., Larson, P. S., and Haag, H. B., *J. Pharm. Exptl. Therap.*, **91**, 357 (1947).
56. Fishel, J. B., and Haskins, J. F., *Ind. Eng. Chem.*, **41**, 1374 (1949).
57. Fodor, A., and Reifenberg, A., *Z. physiol. Chem.*, **162**, 1 (1926/27).
58. Frankenburg, W. G., unpublished results from the laboratory of *General Cigar Co.*, Lancaster, Pa.

59. Frankenburg, W. G., in *Advances in Enzymology*, Vol. VI, Interscience, New York, 1946, pp. 309-377.
60. Frankenburg, W. G., *Arch. Biochem.*, **14**, 157 (1947).
- 60a. Frankenburg, W. G., *Science*, **107**, 427 (1948).
61. Frankenburg, W. G., and Gottscho, A., *Arch. Biochem.*, **21**, 247 (1949).
62. Frankenburg, W. G., and Gottscho, A., *ibid.*, **23**, 333 (1949).
63. Frankenger, W., *Katalytische Umsetzungen in homogenen und mikroheterogenen Systemen*. Akadem. Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1937.
- 63a. Frey-Wyssling, A., *Vierteljahrsschr. naturforsch. Ges. Zürich*, **88**, 176 (1943).
64. Fries, H., *Anleitung zum Tabaksbau und die Fermentation des Tabaks*. Stuttgart, 1856.
65. Gable, I. U. O., and Kirpilianov, G. I., *Ukrain. Khem. Zhur.*, **4**, 45 (1929).
66. Garner, W. W., *U.S. Dept. Agr., Bur. Plant Ind.*, Bull. No. 105 (1907).
67. Garner, W. W., *U.S. Dept. Agr.*, Bull. No. 141 (1908).
68. Garner, W. W., *The Production of Tobacco*. Blakiston, Philadelphia, Toronto, 1946.
69. Garner, W. W., Bacon, C. W., and Bowling, J. D., *Ind. Eng. Chem.*, **26**, 970 (1934).
70. Garner, W. W., Bacon, C. W., Bowling, J. D., and Brown, D. E., *U.S. Dept. Agr., Tech. Bull.*, **414** (1934).
71. Gärtner, K., Konecz, A., and Tillmann, M., *Z. Untersuch. Lebensm.*, **72**, 524 (1936).
72. Giovannozzi, M., *Boll. tec. reg. ist. sper. coll. tabacchi*, **33**, 186 (1935); **34**, 249 (1937). *Chim. & industrie*, **39**, 361 (1936); **40**, 768 (1937). *Rev. Intern. Tabacs*, **23**, 12, 34, 192 (1948); **24**, 17 (1949). *Il Tobacco*, **52**, 3 (1948).
73. Gribbins, M. F., Reid, J. J., and Haley, D. E., *J. Agr. Research*, **63**, 31 (1941).
74. Gribbins, M. F., Haley, D. E., and Reid, J. J., *ibid.*, **69**, 373 (1944).
75. Griffith, R. B., and Jeffrey, R. N., *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **16**, 438 (1944).
- 75a. Grob, K., *Ber. Schweiz bot. Ges.*, **58**, 172 (1948).
76. Haag, H. B., *J. Lab. Clin. Med.*, **25**, 610 (1940).
77. Haag, H. B., and Larson, P. S., *J. Pharm. Exptl. Therap.*, **76**, 235 (1942).
78. Haag, H. B., and Larson, P. S., *Science*, **97**, 187 (1943).
79. Haag, H. B., Larson, P. S., and Finnegan, J. K., *J. Pharm. Exptl. Therap.*, **85**, 356 (1945).
80. Haines, P. G., Eisner, A., and Woodward, C. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 1258 (1945).
81. Haley, D. E., Nasset, E. S., and Olson, O., *Plant Physiol.*, **3**, 185 (1928).
82. Haley, D. E., Longenecker, J. B., and Olson, O., *ibid.*, **6**, 177 (1931).
83. Happold, C. F., and Raper, H. S., *Biochem. J.*, **19**, 92 (1925).
84. Hasegawa, H., *J. Chem. Soc. Japan*, **7**, 73, 1036 (1931).
85. Hasegawa, H., *Bot. Mag. Tokyo*, **51**, 306 (1937).
86. Hermstädt, S. F., *Gründliche Anleitung zur Kultur der Tabakpflanzen*. Berlin, 1882.
87. Hirmke, K., *Fachl. Mittlg. Oesterr. Tabak-Regie*, **8**, 41 (1908).
- 87a. Howard, W. L., Gage, T. B., and Wender, S. H., *Arch. Biochem.*, in press, 1949.
88. Irving, A. A., and Hankinson, R., *Biochem. J.*, **3**, 87 (1908).
89. Ivanov, N. N., Ivanova, V. E., and Larianova, N. N., *Arch. sci. biol., U.S.S.R.*, **43**, 373 (1936).
90. Jackson, H., and Kendal, L. P., *Biochem. J.*, **44**, 477 (1949).
91. James, W. O., *Ann. Rev. Biochem.*, **15**, 417 (1946).

92. James, W. O., Roberts, E. A. H., Beevers, H., and DeKock, P. C., *Biochem. J.*, **43**, 626 (1948).
93. Jansen, E. F., MacDonnell, L. R., and Ward, W. H., *Arch. Biochem.*, **21**, 149 (1949).
94. Jenkins, E. H., *Conn. Agr. Expt. Sta.*, reports for 1893, 1894, 1914.
95. Jensen, C. O., and Haley, D. E., *J. Agr. Research*, **51**, 267 (1935).
96. Jensen, C. O., and Parmele, H. B., *Ind. Eng. Chem.*, **42**, 519 (1950).
97. Jensen, H., *Centr. Bakt.*, **21**, 469 (1908).
98. Jensen, H., *Mededeel. Proefsta. Vorstenland. Tabak*, **12**, 22 (1915).
99. Jetta, G., *Boll. tec. reg. ist. coll. tabacchi*, **2**, 229 (1903); **3**, 25 (1904); **5**, 42 (1906).
100. Joergensen, A. C. P., *Microorganisms and Fermentation*. London, 1925.
101. Johnson, E. F., *Ann. J. Pharm.*, **118**, 1 (1946).
102. Johnson, J., *J. Agr. Research*, **49**, 137 (1934).
103. Johnson, J., *Agr. Expt. Sta. Univ. Wisconsin*, Bull. No. 140 (1941).
104. Johnson, J., Ogden, W. B., and Attoe, O. J., *ibid.*, Bull. No. 153 (1944).
105. Johnson, S. W., *Conn. Agr. Expt. Sta.*, report for 1892.
106. Jouravsky, G. I., *Pub. State Inst. Tobacco and Makhorka Ind., Krasnodar, U.S.S.R.*, Bull. No. 58 (1929).
107. Karrer, P., *Helv. Chim. Acta*, **8**, 364 (1925); **9**, 458 (1926).
108. Kenyon, R. L., Hasek, R. H., Davy, L. G., and Broadbrooks, K. J., *Ind. Eng. Chem.*, **41**, 2 (1949).
109. Kertész, Z., *Ergeb. Enzymforsch.*, **5**, 236 (1936).
110. Kingsbury, A. W., Mindler, A. B., and Gilwood, M. E., *Chem. Eng. Progress*, **44**, No. 7; *Trans. Am. Inst. Chem. Engrs.*, 497 (1948).
111. Kissling, R., *Chem. Ztg.*, **26**, 672 (1902); **28**, 453 (1904).
112. Kissling, R., *Tabakskunde, Tabaksbau und Tabakfabrikation*. Berlin, 1925.
113. Kissling, R., *Handbuch der Tabakskunde, etc.* 5th ed., Parey, Berlin, 1935.
114. Klein, L., *Fifth Report of Agr. Bol. Expt. Sta., Karlsruhe* (1896).
115. Knox, W. E., *J. Biol. Chem.*, **163**, 699 (1946).
116. König, C. J., *Centr. Bakt.*, **2**, 344 (1909).
117. Koenig, P., and Dörr, W., *Biochem. Z.*, **263**, 295 (1933).
118. Kolenev, A. H., *Pub. State Inst. Tobacco Invest. Krasnodar, U.S.S.R.*, Bull. No. 5 (1917); 6 (1917); 7 (1917).
119. Koller, J. B. C., *Der Tabak in naturwissenschaftlicher, landwirtschaftlicher und technischer Beziehung*. Augsburg, 1858.
120. Koning, C. J., *De Natur, Tijdschr. voor toegepaste scheikunde en hygiene*, Deel I, 1897; *Der Tabak*, Amsterdam and Leipzig, 1900.
121. Koser, S. A., and Baird, G. R., *J. Infectious Diseases*, **75**, 250 (1944).
122. Kósutany, T., *Chemical-physiological Investigations of Characteristic Hungarian Tobacco Types*. Budapest, 1882.
123. Kourilo, M., *J. pharm. chim.*, **26**, 445 (1937).
124. Kraybill, H. R., *Ind. Eng. Chem.*, **8**, 336 (1916).
125. Krewson, C. F., and Couch, J. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 257 (1948).
126. Larson, P. S., private communication to the author, 1949.
127. Larson, P. S., and Haag, H. B., *J. Pharm. Exptl. Therap.*, **76**, 240 (1942); **77**, 343 (1943).
128. Larson, P. S., Haag, H. B., and Finnegan, J. K., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **64**, 476 (1947).
129. Larson, P. S., Haag, H. B., and Finnegan, J. K., *ibid.*, **58**, 231 (1945).

130. Larson, P. S., Haag, H. G., and Finnegan, J. K., *J. Pharm. Exptl. Therap.*, **86**, 239 (1946).
131. Larson, P. S., Finnegan, J. K., and Haag, H. B., *ibid.*, **95**, 506 (1949); **88**, 82 (1946).
132. Le Compte, Stuart B., Jr., *Am. J. Botany*, **33**, 726 (1946).
133. Lehmann, K. B., *Arch. Hyg.*, **68**, 319 (1908).
134. Lien Piao Li, and Bonner, J., *Biochem. J.*, **41**, 105 (1947).
135. Loew, O., *U. S. Dept. Agr. Bull.*, No. 59 (1899); No. 65 (1900); No. 68 (1901).
136. Maillard, L. G., *Ann. chim.*, **5**, 258 (1916).
137. McKee, H. S., *The New Phytologist, Australia*, **48**, 1 (1949).
138. McKinstry, D. W., Haley, D. E., and Reid, J. J., *J. Bact.*, **35**, 71 (1938).
139. McMurtrey, J. E., Jr., Bowling, J. D., Brown, D. E., and Engle, H. B., *J. Agr. Research*, **75**, 215 (1947).
140. Miciol, M., *Mém. manufact. de l'état tabacs*, **2**, 182 (1891).
141. Mihailovici, I., and Constantinescu, P. G., *Bul. cult. ferment. Tutunului*, **2**, 131 (1937).
142. Molinari, E., *Fachl. Mittlg. Oesterr. Tabak-Regie*, **2**, 23 (1933).
143. Molinari, E., *ibid.*, **3**, 14 (1936).
144. Mosca, T. F., *Gazz. chim. ital.*, **43**, 428, 431 (1913).
145. Müller-Thurgau, *Landw. Jahrb.*, **14**, 465 (1885).
146. Naghski, J., Beinhart, E. G., and Couch, J. F., *Ind. Eng. Chem.*, **36**, 556 (1944).
147. Nessler, J., *Der Tabak*. Mannheim, 1867.
148. Neuberg, C., and Burkard, J., *Biochem. Z.*, **243**, 472 (1931).
149. Neuberg, C., and Kobel, M., *ibid.*, **179**, 459 (1926); **190**, 232 (1927).
150. Neuberg, C., and Kobel, M., *ibid.*; **229**, 455 (1930).
151. Neuberg, C., and Kobel, M., *Naturwissenschaften*, **23**, 800 (1935); *Enzymologia*, **1**, 177 (1936).
152. Neuberg, C., and Ottenstein, B., *Biochem. Z.*, **188**, 217 (1927); **197**, 491 (1928).
153. Neuberg, C., and Scheuer, M., *ibid.*, **243**, 461 (1931).
154. Nichol, C. A., and Michaelis, M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **66**, 70 (1947).
155. Nijholt, J. A., *Landbouw*, **16**, 655 (1940).
156. Obabko, V. A., *Pub. State Inst. Tobacco and Makhorka Ind., Krasnodar, U.S.S.R.*, Bull. Nos. **105**, **142**, **176** (1940).
157. Ogg, C. L., Brand, R. W., and Willits, C. O., *J. Assoc. Off. Agr. Chem.*, **31**, 633 (1948).
158. Palfray, L., Sabetay, S., Sabourin, L., and Emmanuel, H. F., *Ann. chim. anlyl.*, **23**, 311 (1941).
159. Pearsall, W. H., and Billimoria, M. C., *Ann. Botany*, **2**, 317 (1938).
160. Pearsall, W. H., and Billimoria, M. C., *ibid.*, **3**, 601 (1939).
161. Petrik, S. M., *Pub. State Inst. Tobacco Invest., Krasnodar, U.S.S.R.*, Bull. No. **63** (1929).
162. Pinat, R., and Grouvelle, M., *Mém. manif. de l'état tabacs*, **2**, 33 (1889).
163. Platt, S. B., and Wormall, A., *Biochem. J.*, **21**, 26 (1927).
164. Plotho, O. v., *Naturwissenschaften*, **124** (1946).
165. Popoff, N., *Food Ind. U.S.S.R.*, **5** (1930).
166. Porter, W. L., Brice, B. A., Copley, M. J., and Couch, J. F., *Eastern Regl. Research Lab., U. S. Dept. Agr., Report, AIC-159* (1947).
- 166a. Porter, W. L., Naghski, J., and Eisner, A., *Arch. Biochem.*, in press, 1949.
167. Preiss, W., *Z. Untersuch. Lebensm.*, **77**, 272 (1939).

168. Prescott, S. C., and Dunn, C. G., *Industrial Microbiology*, McGraw-Hill, New York, 1940.
169. Pucher, G. W., and Vickery, H. R., *J. Biol. Chem.*, **178**, 557 (1949).
170. Pyatnitskii, M., and Kashirin, S., *Vsesoyuz. Inst. Tabach. i. Makhoroch.*, Prom. No. **133**, 47 (1937).
171. Pyriki, C., *Z. Untersuch. Lebensm.*, **77**, 164 (1939).
172. Pyriki, C., *ibid.*, **88**, 372 (1948).
173. Pyriki, C., *ibid.*, **88**, 404 (1948).
174. Reid, J. J., Haley, D. E., McKinstry, D. W., and Surmatis, J. D., *J. Bact.*, **34**, 460 (1937).
175. Reid, J. J., McKinstry, D. W., and Haley, D. E., *Penns. Agr. Exp. Sta.*, Bull No. **356** (1938); Bull. No. **363** (1938).
176. Reid, J. J., McKinstry, D. W., and Haley, D. F., *Science*, **86**, 404 (1937).
177. Reifer, I., and Melville, J., *J. Biol. Chem.*, **178**, 715 (1949).
178. Ridgway, C. A., *J. Agr. Research*, **7**, 269 (1916).
179. Roberts, E. A. H., *Nature*, **148**, 285 (1941).
180. Roberts, E. A. H., *Biochem. J.*, **35**, 1289 (1941).
181. Roberts, E. A. H., private communication, 1947.
182. Roberts, E. A. H., and Sarma, S. N., *Biochem. J.*, **34**, 1517 (1940).
183. Robinson, E., and Nelson, J., *Arch. Biochem.*, **4**, 111 (1944).
184. Ruckdeschel, W., *Dissertation*, Techn. Hochschule, München, 1914; *Z. ges. Brauw.*, **37**, 430, 437 (1914).
185. Sabetay, S., Trabaud, L., and Emmanuel, H. F., *Chim. & industrie*, **46**, 429 (1941); *Compt. rend.*, **218**, 321 (1941).
186. Sabetay, S., and Panouse, J., *ibid.*, **225**, 887 (1947).
187. Schlösing, T., *Mém. Manufact. de l'état Tabacs*, **1**, 515, 552 (1888).
188. Schlösing, T., *ibid.*, **2**, 119, 192 (1889).
189. Schlösing, T., and Grandeau, L., *Le Tabac*. Paris, 1868.
190. Schmidt, J. J., *Tropenpflanzer*, **25**, 64 (1925).
191. Schoulties, A. L., and Wender, S. H., *Trans. Kentucky Acad. Sci.*, **12**, 10 (1947).
192. Schoulties, A. L., and Wender, S. H., *Proc. Oklahoma Acad. Sci.*, **27**, 95 (1947).
193. Schweitzer, K., *Biochem. Z.*, **78**, 37 (1916).
194. Shmuk, A., *Pub. Inst. Tobacco Ind., Krasnodar, U.S.S.R.*, **19** (1923).
195. Shmuk, A., *Pub. State Inst. Tobacco and Makhorka Ind., Krasnodar, U.S.S.R.*, Bull. No. **33** (1927).
196. Shmuk, A., *ibid.*, Bull. No. **50** (1929).
197. Shmuk, A., and Kashirin, S., *Pub. State Inst. Tobacco Ind., Krasnodar, U.S.S.R.*, Bull. No. **69** (1930).
198. Shmuk, A., and Semnova, V., *ibid.*, Bull. No. **33** (1927).
199. Sinclair, W. B., and Eny, D. M., *Plant Physiol.*, **21**, 522 (1946).
200. Smirnov, A. I., *Pub. State Inst. Tobacco Ind., Krasnodar, U.S.S.R.*, Bull. No. **34** (1927).
201. Smirnov, A. I., *ibid.*, Bull. No. **39** (1927).
202. Smirnov, A. I., *Physiological-Biochemical Principles of Tobacco*. Krasnodar. U.S.S.R., 1933.
203. Smirnov, A. I., *Biochimie des Tabaks*. W. Junk, The Hague, 1940.
204. Smirnov, A. I., and Moroz-Morozenko, M. G., *Pub. State Inst. Tobacco Ind., Krasnodar, U.S.S.R.*, Bull. No. **118** (1935); *Z. Untersuch. Lebensm.*, **72**, 172 (1936); **74**, 396 (1937).

205. Smirnov, A. I., and Petrik, S. M., *Pub. State Inst. Tobacco Ind., Krasnodar, U.S.S.R.*, Bull. No. 72 (1930).
206. Street, H. E., in *Advances in Enzymology*, Vol. IX. Interscience, New York, 1949, p. 391.
207. Street, O. E., *Conn. Agr. Expt. Sta.*, Bull. No. 410 (1937).
208. Suchsland, E., *Bsr. deut. botan. Gese.*, 9, 79 (1891).
209. Swain, L., Eisner, A., Woodward, C. F., and Brice, B. A., *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 1341 (1949).
210. Symons, J. W., *Can. Chem. Met.*, 19, 259 (1935).
211. Szent-Györgyi, *Studies on Biological Oxidation and Some of Its Catalysts*. Barth, Leipzig, 1937.
212. Thorpe and Holmes, *Proc. Chem. Soc. London*, 17, 170 (1901); *J. Chem. Soc.*, 79, 982 (1901).
213. Tóth, J., *Chem. Ztg.*, 33, 338 (1909).
214. Trankwilizkaia, H. A., *Pub. State Inst. Tobacco Ind., Krasnodar, U.S.S.R.*, Bull. No. 20, 14 (1924).
215. Verhagen, D., and Wender, S. H., *Trans. Kentucky Acad. Sci.*, 11, 36 (1934).
216. Vernhout, J. H., *Ber. Lands. Plantentuin*, 34, 9 (1899); *Centr. Bakt.*, 4, 778 (1899).
217. Vickery, H. B., and Abrahams, M. D., *J. Biol. Chem.*, 180, 37 (1949).
218. Vickery, H. B., and Pucher, G. W., *Science*, 73, 397 (1931).
219. Vickery, H. B., and Pucher, G. W., *Conn. Agr. Exp. Sta.*, Bull. No. 323 (1931).
220. Vickery, H. B., and Pucher, G. W., *ibid.*, Bull. No. 324 (1931).
221. Vickery, H. B., and Pucher, G. W., *ibid.*, Bull. No. 352 (1933).
222. Vickery, H. B., Pucher, G. W., Wakeman, A. J., and Leavenworth, C. S., *ibid.*, Bull. No. 399 (1937).
223. Vickery, H. B., Pucher, G. W., Wakeman, A. J., and Leavenworth, C. S., *ibid.*, Bull. No. 442, 65 (1940).
224. Vickery, H. B., Pucher, G. W., Wakeman, A. J., and Leavenworth, C. S., *ibid.*, Bull. No. 496 (1946).
225. Vladescu, I., and Dimofte, N., *Bul. cult. ferment. Tutunului*, 25, 70 (1936).
226. Vladescu, I., and Dimofte, N., *Z. Untersuch. Lebensm.*, 71, 358 (1936).
227. Vladescu, I., Dimofte, N., and Zaporojanu, I., *Bul. cult. ferment. Tutunului*, 23, 385 (1936).
228. Volgunov, G. P., *Pub. State Inst. Tobacco Ind., Krasnodar, U.S.S.R.*, Bull. No. 83, 37 (1932).
229. Volgunov, G. P., *Vsesoyuz. Nauch.-Issledovatel. Inst. Tabachi Makhoroch.*, Prom. No. 134, 128 (1938).
230. Vriens, J. G. C., and Tijmstra, S., *Mededeel. Deli Proefsta. Medan*, 6, 301 (1912); 7, 16 (1912).
231. Wall, M. E., *Ind. Eng. Chem.*, 41, 1465 (1949).
232. Ward, G. M., *Dominion of Canada, Dept. Agr.*, Publ. 729; *Tech. Bull.* 37 (1942).
233. Weber, K., *Lebensm. Untersuch. und Hyg.*, 26, 214 (1935).
234. Weil, L., *Science*, 107, 426 (1948).
235. Wenusch, A., *Fachl. Mittlg. Oesterr. Tabak-Regie*, 3, 6 (1933).
236. Wenusch, A., *Oesterr. Chem. Ztg.*, 42, 226 (1939).
237. Wenusch, A., *Der Tabakrauch*. A. Geist, Bremen, 1939.
238. Werle, E., *Biochem. Z.*, 298, 269 (1938).
239. Werle, E., and Becker, H. W., *Biochem. Z.*, 313, 182 (1942).
240. Werle, E., and Koebke, K., *Ann.*, 562, 60 (1949).
241. Werle, E., and Müller, R., *Biochem. Z.*, 308, 355 (1941).

242. Werle, E., and Uschold, E., *ibid.*, **318**, 531 (1948).
243. Whitney, M., and Means, T., *U. S. Dept. Agr.*, Rept. No. 60 (1899).
244. Wildman, S. G., Campbell, J. M., and Bonner, J., *J. Biol. Chem.*, **180**, 273 (1949).
245. Willits, C. O., Coe, M. R., and Ogg, C. L., *J. Assoc. Off. Agr. Chem.*, **32**, 118 (1949).
246. Woodward, C. F., Eisner, A., and Haines, P. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 911 (1944).
247. Zaporozjanu, I., *Bul. cult. ferment. Tutunului*, **28**, 454 (1939).
248. Zaporozjanu, I., *ibid.*, **33**, 261 (1944).

1072

ASSIMILATION OF HYDROCARBONS BY MICROORGANISMS*

By CLAUDE E. ZOBELL, *La Jolla, California*

CONTENTS

I. Introduction.....	444
II. Experimental Methods.....	445
A. Modification of Hydrocarbons.....	445
B. Microbial Multiplication.....	446
C. Oxygen Uptake.....	446
D. Methylene Blue Reduction.....	447
E. Carbon Dioxide Production.....	447
F. Nitrate and Sulfate Reduction.....	448
G. Methods of Dispersing Hydrocarbons in Medium.....	448
III. Occurrence of Hydrocarbon-Oxidizing Organisms.....	449
IV. Action of Hydrocarbons on Microorganisms.....	451
A. Antiseptic Hydrocarbons.....	451
B. Selective Action of Hydrocarbons.....	452
C. Preservation of Cultures under Oil.....	453
V. Microbial Oxidation of Gaseous Hydrocarbons.....	454
VI. Relative Oxidizability of Different Classes of Hydrocarbons.....	456
A. Aliphatic <i>vs.</i> Aromatic Compounds.....	456
B. Effect of Chain Length on Oxidizability of Hydrocarbons....	457
C. Effect of Unsaturation or Double Bonds.....	459
D. Effect of Branching or Side Chains.....	460
E. Polycyclic Hydrocarbons.....	461
VII. Action of Microorganisms on Hydrocarbon Derivatives.....	462
VIII. Products of Hydrocarbon Oxidation.....	464
A. Cell Substance.....	464
B. Carbon Dioxide.....	465
C. Organic Acids.....	466
D. Aldehydes.....	467
E. Alcohols and Oxyphenols.....	467
F. Modified Hydrocarbons and Pigments.....	469
IX. Microbial Modification of Petroleum and Its Products.....	470
A. Rate of Oxidation of Oil.....	471
B. Extent of Change.....	472
C. Petroleum Products.....	473
X. Microbial Decomposition of Rubber Hydrocarbons.....	474
XI. Assimilation of Hydrocarbons by Animals.....	476
A. Paraffinic Hydrocarbons.....	476
B. Aromatic Hydrocarbons.....	477
XII. Production of Hydrocarbons by Microorganisms.....	478
XIII. Summary and Conclusions.....	479
References.....	481

* Contribution from the Scripps Institution of Oceanography, University of California, New Series No. 438. This paper is a contribution from American Petroleum Institute Research Project 43A.

I. Introduction

A good many organisms, ranging in complexity from bacteria to man, absorb and assimilate certain hydrocarbons. Virtually all kinds and classes of hydrocarbons appear to be susceptible to attack by bacteria, yeasts, molds, or other allied microorganisms. The ability of microorganisms to attack hydrocarbons seems to be quite general rather than unique. This may prove to be true of higher animals also, but very little experimental evidence is available in face of the fact that hydrocarbons have been thought of as being biologically inert.

Besides being of importance in the metabolism of organisms, the assimilation of hydrocarbons is of considerable significance in nature and industry. The fact that hydrocarbons generally do not occur in deposits of decomposing plant and animal debris to the extent that they occur in living organisms (25,26,142) is *a priori* evidence that hydrocarbons are decomposed in all except peculiar environments, *e.g.*, source bed of petroleum, where conditions favor their preservation. Otherwise, the tendency would be for the earth's carbon to accumulate in hydrocarbons.

Petroleum or its products, in contact with water, may be modified by the action of hydrocarbon-oxidizing microorganisms (20,76,110, 158,186,195,197,215,226,227). Such organisms are believed to be responsible for the rapid disappearance of petroleum pollution in waterways (10,74), or wherever oil is spilled on water or soil (148,226). Hydrocarbon-oxidizing bacteria have been incriminated in the deterioration of both natural and synthetic rubber (127,160,163,232) and in the corrosion of underground pipelines and electrical conduits coated with paraffin-impregnated materials, elastomers, or other hydrocarbon products. The growth of hydrocarbon-oxidizing bacteria in aqueous medicinal or pharmaceutical preparations having hydrocarbon bases has resulted in discolored or otherwise altered products. Afflictions in human patients as well as other undesirable effects in cooling or cutting oils have been traced to the profuse growth of hydrocarbon-oxidizing bacteria (36,37,45,107,108).

On the positive side of the ledger are numerous proved or promising beneficial effects from hydrocarbon-oxidizing microorganisms such as, for example, the conversion of methane or higher hydrocarbons into useful organic acids or other products (174,179). Observations on hydrocarbon-oxidizing microorganisms suggest many applications

in the discovery, recovery, and refining of petroleum (143,177,178, 180,196,228).

Dating from 1895 when Miyoshi (114) reported the attack of paraffin by *Botrytis cinerea*, more than one hundred species representing about forty genera of bacteria, yeasts, and molds have been shown by various workers to be able to utilize one or more kinds of hydrocarbons (76,128,148,189,226). Such microbes, which attack gaseous, liquid, and solid hydrocarbons of the aliphatic, olefinic, aromatic, and naphthenic series, have been shown to be quite widely distributed in nature. Besides a large number of pure hydrocarbons which have been investigated, various workers have demonstrated the microbial assimilation of crude oils, gasolines, lubricating oils, tars, asphalts, illuminating gases, natural and synthetic rubbers, paraffin waxes, petrolatums, mineral oils, petroleum ethers, and other mixtures of hydrocarbons.

Reviews of the scattered literature on the microbial assimilation of petroleum and its products have been prepared by Haas (66), Hessel (76), Osnitskaya (128), Tausson (189), and ZoBell (226).

II. Experimental Methods

A. MODIFICATION OF HYDROCARBONS

Commonest of the criteria for detecting the microbial utilization of liquid or solid hydrocarbons is their modification in media inoculated with the microorganisms in question. The pitting of paraffin wax, for example, or a decrease in the quantity of oil is indicative of utilization. The emulsification of various kinds of oil by microorganisms has been observed by numerous investigators (19,20,123,197,227). Likewise microorganisms may bring about color changes in oils or cause their complete disappearance (186). Tausson (188) followed the microbial decomposition of phenanthrene by noting the dissolution of crystals. Bacterial erosion of naphthalene crystals has also been observed (185).

Söhngen (158) observed the disappearance of as much as 7.5 mg. of crude oil per day per square decimeter of oil exposed to the culture. Tausz and Peter (197) noted changes in layers of crude oil 1 to 2 mm. thick after three days' incubation at 25°C., and within two weeks the oil had disappeared from the surface of the medium in which bacteria were growing. Wagner (215) reported the destruction of 1 g. of crude oil in eight days by *Bacterium benzoli* growing in 100 cc. of mineral solution enriched with oil.

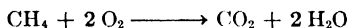
B. MICROBIAL MULTIPLICATION

When microorganisms multiply in mineral salt solutions enriched with gaseous, liquid, or solid hydrocarbons as the sole source of energy and carbon, it is safe to assume that the hydrocarbon is utilized. Bacteria and yeasts may multiply in sufficient numbers to render hydrocarbon media turbid or they may form pellicles. Mold mycelia may appear throughout the medium or float in mats on the surface. Bacterial populations exceeding one billion per cubic centimeter have been detected in mineral media inoculated with soil and enriched with biphenyl, cetane, naphthalene, or other hydrocarbons (169,173).

Imelik (84) noted the multiplication of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral medium enriched with heptane until at the end of 4 days' incubation there were 10^7 cells/cc., as compared with 10^8 cells/cc. of medium enriched with petroleum, 10^{12} cells/cc. in medium enriched with gasoline or glucose, and 10^{13} cells/cc. of medium enriched with petroleum jelly. Species of *Actinomyces*, *Sarcina*, and *Monilia* also multiplied in mineral medium enriched with petroleum or its products.

C. OXYGEN UPTAKE

Oxygen consumption by aerobes in mineral salt solutions containing hydrocarbons as the only oxidizable matter has been quite extensively employed as a criterion of hydrocarbon oxidation (60,78,234). The microbial oxidation of methane has been studied (72,82,101,118,180) by following changes in the volume and composition of the gas phase:



By means of a siphon going to the bottom of a one-hole stoppered bottle containing inoculated mineral salt solution in an atmosphere of methane and oxygen, Söhngen (158) connected a cotton-plugged bottle containing sterile medium in such a way that any decrease in gas volume in the culture bottle resulted in the aspiration of sterile medium into the culture bottle. In this way gas consumption could be observed from day to day without interrupting the experiment. The technique has been adapted by other workers to the study of the microbial oxidation of various gaseous, liquid, and solid hydrocarbons. The volume of oxygen consumed always exceeds the volume of carbon dioxide produced.

Decreases in gas volume attributable to oxygen consumption resulting from the microbial oxidation of hydrocarbons have also been followed by manometric methods. Employing Warburg manometers, Stone *et al.* (169,170) found that light oils undergoing oxidation by mixed cultures gave respiratory quotients of around 0.63, as compared with a theoretical value of 0.67 for paraffin hydrocarbons, $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$, oxidized completely to carbon dioxide and water. The fermentation of heavy oils gave lower values, thereby indicating that there was less

tendency for longer molecules of hydrocarbons to be oxidized completely to carbon dioxide and water than for shorter molecules.

Bacterial cultures investigated by Bushnell and Haas (19) gave R.Q. (respiratory quotient) values ranging from 0.30 to 0.70, with no apparent correlation between R.Q. and the nature of the hydrocarbon undergoing oxidation. The R.Q. of washed cells of *Bacterium aliphaticum*, as observed by Johnson *et al.* (97), averaged 0.47 for heptane, 0.48 for octane, 0.63 for nonane, and 0.63 for dodecane, as compared with 0.88 for glucose. The R.Q. for the bacterial oxidation of biphenyl (96) was 0.73, or 89% of the theoretical value for complete oxidation to carbon dioxide and water.

Oxygen consumption, in a glass-stoppered bottle filled to capacity with mineral solution enriched with hydrocarbon as the sole source of energy, has been used for studying the microbial oxidation of petroleum (77,234) and rubber (232) hydrocarbons. This B.O.D. technique, in which dissolved oxygen is determined by the Winkler method, has also been applied to estimating the abundance of hydrocarbon-oxidizing bacteria in sea water, sediment, and soil samples by the minimum dilution method.

D. METHYLENE BLUE REDUCTION

Tausz and Donath (196) reported the decoloration of methylene blue resulting from the action of *Bacterium aliphaticum liquefaciens* upon hexane. The reduction of methylene blue or similar redox indicators in mineral solutions enriched with hydrocarbons constitutes proof for the oxidation of the hydrocarbons, but there are a good many microorganisms which oxidize hydrocarbons without affecting the color of such indicators (226).

E. CARBON DIOXIDE PRODUCTION

Carbon dioxide seems to be the principal product resulting from the microbial oxidation of hydrocarbons (20,64,182,183,191,215). From 80 to 90% of the carbon in the hydrocarbons decomposed by the soil bacteria studied by Büttner (20) could be accounted for as carbon dioxide. According to data given by Söhngen (157), it is estimated that about half of the methane assimilated by *Methanomonas methanica* was oxidized to carbon dioxide and the other half was converted into bacterial cell substance and intermediate products. Söhngen (158) measured carbon dioxide production to indicate the relative rates of oxidation of paraffin oil and paraffin wax by various organisms.

The amount of carbon dioxide produced may be measured as such or its formation may be indicated by a decrease in the *pH* of the medium. Carbon dioxide plus organic acids formed by the microbial oxidation of hydrocarbons may decrease the *pH* of the medium from 0.2 to 2 units.

Sisler and ZoBell (154) measured carbon dioxide formation for following the microbial oxidation of naphthalene, anthracene, phenanthrene, 1,2-benzanthracene, 1,2,5,6-dibenzanthracene, and other carcinogenic hydrocarbons.

F. NITRATE AND SULFATE REDUCTION

A good many microorganisms reduce nitrate to nitrite in hydrocarbon media. Since it is easy to test for nitrate or nitrite, this is another useful criterion for the microbial utilization of hydrocarbons, although negative results are not infallible.

The same may be said regarding anaerobic sulfate-reducing bacteria, some strains of which assimilate certain hydrocarbons (125,139, 230,235), as indicated by hydrogen sulfide formation. The utilization of paraffin hydrocarbons higher than C_{10} by sulfate reducers was reported by Tausson and Aleshina (191), who postulated that heavy paraffins are thus converted into naphthenic or polymethylene hydrocarbons. Naphthalene, phenanthrene, and retene are attacked by sulfate reducers, according to Tausson and Vesselov (194).

The reduction of sulfates at the expense of hydrocarbons has also been reported by Schneegans (144). The rapid destruction of long-chain aliphatic hydrocarbons, various crude oils, kerosene, lubricating oil, and mineral oil by 27 different cultures of sulfate reducers was reported by Rosenfeld (139), who averred that hydrocarbon utilization by *Desulfovibrio* species is associated with the presence of a dehydrogenase system.

G. METHODS OF DISPERSING HYDROCARBONS IN MEDIUM

Since most hydrocarbons are only very slightly soluble in water, the rate at which they are attacked by microorganisms depends primarily upon the surface area exposed to enzymic action or the extent to which the hydrocarbons are dispersed in the medium. In general, liquid and solid hydrocarbons have been dispersed either by emulsification or absorption on the surface of sand, asbestos fibers, diatomaceous earth, glass wool, or other particulate material.

The growth of *Mycobacterium album*, *M. rubrum*, *Micrococcus paraffinae*, and other hydrocarbon-oxidizing bacteria was found by Söhlngen (159) to be a function of soil surface. The addition of silicon dioxide or iron oxide stimulated petroleum oxidation. Kieselguhr or other particulate substances coated with paraffin wax provided for the activity of *Serratia marcescens* and other hydrocarbon-oxidizing bacteria observed by Greig-Smith (62). Tausson and Aleshina (191) mixed melted paraffin with powdered glass or kaolin to increase the free surface of paraffin. ZoBell (230) grew sulfate-reducing bacteria in plaster of paris prepared with mineral solution and paraffin oil or wax.

Heavy hydrocarbons may be liquefied by heating or dissolved in volatile solvents preparatory to dispersing them on the surfaces of solid particles. Emulsifying the hydrocarbons in aqueous media with a Waring Blendor and passing the mixture several times through a homogenizer has also yielded gratifying results. Stable emulsions of hydrocarbons, which are attacked by bacteria almost as fast as simple carbohydrates, have been prepared in this way by the author. When admissible, the use of a little gum acacia, gum arabic, or other stabilizing agent is recommended.

III. Occurrence of Hydrocarbon-Oxidizing Organisms

Microorganisms which attack methane, paraffin, or other hydrocarbons appear to be quite commonly present in soil. They are particularly abundant in oil-soaked soil around oil wells, refineries, leaky pipelines, gasoline pumps, etc. They also occur in swamps, lakes, river water, marine bottom deposits, petroleum separation tanks, sedimentation ponds in oil fields, and water bottoms of tanks in which petroleum or its products are stored.

The abundance of hydrocarbon-oxidizing bacteria in oil-soaked soil, petroleum sedimentation ponds, etc., is attributable partly to the development of adaptive enzymes which attack hydrocarbons. It has been observed by the author that many bacteria, yeasts, and molds which normally lack the ability to attack hydrocarbons develop this ability after prolonged cultivation on nutrient media in the presence of mineral oil.

The abundance or activity of methane-oxidizing bacteria in the surface soil overlying subterranean deposits of petroleum is the basis of various geomicrobiological prospecting methods which have been proposed (15,115,143,177,178,180) but are still in the experimental stage. Methane oxidizers occur less abundantly in garden soil (1,55,72,73,101,119,158), sewage (54), and recent marine sediments (82). In this connection it is pointed out that only a few specialized species of bacteria attack methane and only with difficulty. The number of microbial species and the ease of utilization seem to increase with the chain length of paraffinic hydrocarbons, at least up to those in the range of C_{20} to C_{30} .

Paraffin-oxidizing microorganisms in soil have been described by Bushnell and Haas (19), Fleming (49), Gainey (53), Greig-Smith (62), Haag (64,65), Hopkins and Chibnall (79), Jensen (92-94), Rahn (133), Tausson and Aleshina (191), and Umbreit (205). Species of *Actinomyces*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Mycobacterium*, and *Penicillium* which attack paraffin were found in nearly all samples of soil, hay, leaves, manure, and peat examined by Büttner (20).

From 50,000 to 200,000 bacteria which utilized paraffin as a carbon and energy source were found per gram of garden soil by Söhngen (158). Up to 3000 paraffin-decomposing bacteria were detected per cubic centimeter of ditch water. Large numbers were also found in manure. Söhngen divided the paraffin oxidizers into two groups. The first group, which contained lipases, included *Bacterium fluorescens liquefaciens*, *B. pyocyaneum*, *B. lipolyticum* alpha, beta, gamma, and delta, *B. stutzeri*, and *Micrococcus paraffinae*. The second group, which attacked fatty acids but contained no lipase, included *Mycobacterium album*, *M. hyalinum*, *M. lacticola*, *M. luteum*, *M. phlei*, and *M. rubrum*.

Truffault and Bezssonoff (204) isolated bacteria from soil which oxidized paraffin oil, cyclohexane, and methylcyclohexane.

Nearly all of the stock cultures of *Pseudomonas* studied by Haas (66) grew in kerosene media, indicating that the ability to utilize hydrocarbons is a common characteristic of the genus. This also appears to be true of *Mycobacterium* (65,66,94,209) and *Actinomyces* (92,93) species. Vierling (209) isolated 23 strains of *Mycobacterium* from soil, which utilized benzene, petroleum, paraffin oil, and paraffin wax as the only source of carbon. *Mycobacterium lacticola*, isolated from soil by Birch-Hirschfeld (13), oxidized acetylene. Three species of *Actinomyces* and 14 strains of *Proactinomyces* studied by Umbreit (205) utilized paraffin.

Jensen (92) found that the abundance of *Proactinomyces* in soil was greatly increased by the addition of paraffin. Among the numerous organisms isolated from soil, which could utilize paraffin, were *Proactinomyces agrestis*, *P. actinomorphus*, *P. paraffinae*, *P. polychromogenes*, *P. minimus*, *Actinomyces albus*, and two other new species of *Actinomyces* designated "65" and "218W." Jensen (93) later described *Proactinomyces corallinus*, *P. salmonicolor*, and *P. opacus* as paraffin oxidizers. *P. ruber*, *P. polychromogenes*, *Actinomyces violacens-ruber*, *A. albus*, *A. madurae*, and *Penicillium notatum*, studied by Baldacci (6a), grew readily in mineral solution enriched with paraffin wax as the sole source of energy.

Ten species of *Micromonospora*, which utilized either paraffin wax, paraffin oil, or various aromatic hydrocarbons, were found in Wisconsin lake bottoms by Erikson (45). Sturm and Orlova (175) found paraffin-oxidizing bacteria in Ala-Kule Lake, Russia. From medicinal mud Goobin (58) isolated *Bacterium hidium* and other bacteria which

attacked ethane, kerosene, and petroleum ether. Similar bacteria were detected in Dead Sea sediments by Elazari-Volcani (43). Hydrocarbon-oxidizing bacteria are commonly encountered in marine sediments (59,125,126,225,227,232,234). In investigating the use of mineral oils to control mosquito larvae, Headlee and Miller (74) found that the oil film on polluted water was broken by microorganisms which digest hydrocarbons.

A petroleum-oxidizing coccobacillus isolated from oil-well brine was believed by Lipman and Greenberg (109) to have come from a depth of 8700 feet. Ginsburg-Karagitscheva (56,57), Issatshenko *et al.* (88), Maliyantz (110), Wackenhut (214), and ZoBell (227) have recovered hydrocarbon-oxidizing bacteria from oil-well brines from various depths.

Isjurova (86) warned against the use of petrolatum or paraffin oil as sealing agents in B.O.D. tests because of the common occurrence of hydrocarbon-oxidizing bacteria in water and sewage.

IV. Action of Hydrocarbons on Microorganisms

A. ANTISEPTIC HYDROCARBONS

Although certain hydrocarbons are selective antiseptics, the rather common occurrence of bacteria and allied microorganisms associated with petroleum or its products is ample evidence that hydrocarbons are not germicidal for all organisms. Even toluene, which is sometimes employed as a preservative for enzyme preparations, is attacked in all concentrations by several species of bacteria and molds. Pickering (131) noted an increase in the organic content of soil following its treatment with benzene, paraffin oil, or ether, but it remained for later workers to prove that these substances are utilized by bacteria.

Soaking soil with toluene was found by Russell and Hutchinson (141) to cause a temporary decrease in the bacterial population followed by a marked increase. Similar results were observed by Buddin (17) in soil treated with toluene, benzene, cyclohexane, hexane, or pentane. The oxidation of toluene and other aromatic antiseptics by soil bacteria was established by Sen Gupta (151), who found further that phenol and cresol are also susceptible to microbial attack.

That certain soil bacteria can obtain their energy and carbon requirements from toluene, xylene, pseudocumene, mesitylene, naphthalene, cymene, pinene, hexane, benzene, chlorobenzenes, nitrobenzenes, and cresols was confirmed by Matthews (112). Toluene was

oxidized by 25 species representing 7 genera of bacteria isolated from soil by Gray and Thornton (61). Naphthalene, phenol, or cresol was attacked by bacteria in 146 out of 245 soil samples examined.

Naphthalene, which is lethal for many microorganisms and which has been used as a soil "antiseptic," cannot be depended upon to sterilize soil. It actually promotes the growth of certain organisms (61,89,181). The addition of 1.28 g. of naphthalene to 100 g. of soil was observed by Jacobs (89) to result in an increase of the bacterial population from an initial count of a few million per gram to more than three billion per gram. Similar results were obtained by Tattersfield (181), who noted that whereas about 50 days were required for the disappearance of 50 mg. of naphthalene from 100 g. of soil initially treated, the second 50 mg. of naphthalene disappeared in 20 days and the third 50 mg. disappeared in 10 days.

Part of the increase in the bacterial population of soil treated with hydrocarbons is definitely due to their assimilation by bacteria and partly to a lethal action of the hydrocarbons on soil fauna, the dead bodies of which are oxidized by bacteria (89,112,181). Not only are aromatic hydrocarbons lethal for many forms; all paraffin oils studied by Marsland (111) from octane, C_8H_{18} , to tetradecane, $C_{14}H_{30}$, induced narcosis or death when applied to the surface of *Amoeba dubia*. According to Dawson and Belkin (30), *Amoeba proteus* was not injured by the injection of mineral oil.

Von Oettingen (212) rated octane as the most toxic of the saturated paraffinic hydrocarbons. Olefins are more toxic for animals than the corresponding saturated compounds, cycloparaffins are more toxic than olefins, and aromatic hydrocarbons are, in general, more toxic than homologous cycloparaffins. Toxicity generally increases with the number of side chains.

B. SELECTIVE ACTION OF HYDROCARBONS

The selective action of petroleum ether on enteric organisms is the basis of certain cultural methods for separating them (12,69,78,147, 216). Bierast (12) reported that *Escherichia coli* was killed by treatment with petroleum ether which injured neither typhoid nor paratyphoid bacilli. After confirming and extending these observations, Hall (69) proposed the addition of pentane to nutrient broth to inhibit *E. coli* and to promote the growth of *Eberthella typhi*. Heyn (78) and Schuscha (147) claimed success in detecting typhoid organisms in pol-

luted water by treatment with petroleum ether. Walbum (216) failed to find any consistent difference in the susceptibility of different enteric organisms to petroleum ether, although there was a close relationship between the germicidal effect of 30 different petroleum fractions examined and their boiling points. In general, light ends were more germicidal than heavier hydrocarbons.

Baier (6) erroneously believed that the germicidal property of hydrocarbons is largely a function of their solubility in water. Jentsch (95) attributed the germicidal effect of illuminating gas to the presence of cyclic hydrocarbons, although it is now known that many microorganisms may tolerate high concentrations of benzene, toluene, or xylene and actually attack these compounds (45,61,112,151,189,215, 234). The antiseptic property of hydrocarbons was found by Van de Velde (207) to be roughly parallel to their oxidizability by potassium permanganate, mesitylene and xylenes being more effective antiseptics than benzene or toluene.

At this writing there seem to be too many unexplained peculiarities of microorganisms and their enzymes as well as unknown effects of experimental conditions to warrant any rigorous generalizations regarding what determines whether hydrocarbons will be harmful or beneficial. Certainly it is a dangerous and unwarranted assumption to consider either gaseous, liquid, or solid hydrocarbons to be biologically inert.

C. PRESERVATION OF CULTURES UNDER OIL

Covering microbial cultures with a layer of colorless mineral oil has been recommended as an effective way to preserve them for prolonged periods of time (14, 18,117,124,217). Delicate cultures of pneumococcus, meningococcus, gonococcus, streptococcus, and influenza bacilli, investigated by Birkhaug (14) and Parish (129), remained alive for several months in nutrient media overlaid with liquid paraffin. Details of the procedure for preserving bacterial cultures under paraffin oil and a review of the relevant literature are given by Morton and Pulaski (117).

Sherf (152) maintained cultures of *Alternaria*, *Fusarium*, and *Phytophthora* under mineral oil for several months. Buell and Weston (18) recommended the application of a layer of recently autoclaved heavy mineral oil about 1 cm. above the tip of agar slant cultures of fungi. The beneficial effect of the oil upon the prolonged survival of fungous cultures was attributed to: (a) the exclusion of oxygen with a resultant decrease in the metabolic activity of the fungi, (b) the retardation of dehydration of the medium, and (c) the exclusion of mites and other contaminating organisms. Edwards *et al.* (39) found that the oxygen consumption of fungous cultures was a function of the depth of overlaying oil.

The growth of fungi and bacteria on nutrient agar overlaid with oil was employed by Young (219) as a criterion of the oil's toxicity for vegetation. Toxicity of oils was found to increase with their sulfonatability. Hyaline, nearly unsulfonatable petroleum oils were useful for preserving cultures of bacteria and fungi. Mold mycelia and some bacteria grew through oil 1 to 5 mm. along the glass walls of culture receptacles. Tomkins (203) reported the penetration and utilization of vaseline by molds.

V. Microbial Oxidation of Gaseous Hydrocarbons

There seems to be more specificity in the ability of bacteria to attack gaseous hydrocarbons than higher homologs, probably because the latter have more vulnerable points and are thermodynamically less stable than short molecules. The greater oxidizability of higher homologs, however, is partly offset by their decreasing solubility with increasing complexity.

In order to account for the low incidence of methane in the atmosphere in spite of its abundant formation in swamps, soil, etc., Urbain (206) postulated that it was either oxidized by ozone in the atmosphere or in the presence of green plants, probably by bacteria. Then almost simultaneously Kaserer (101) and Söhngen (156) proved the bacterial oxidation of methane.

The physiology and ecology of methane-oxidizing bacteria have been studied by Söhngen (157,158), Störmer (171), Giglioli and Masoni (54,55), Harrison and Aiyer (72), Münz (118,119), Aiyer (1), Hase-mann (73), Yurovskii *et al.* (220), Wiken (218), Hutton (82), Slavina (155a,b), and many others. However, owing to technical difficulties encountered in studying them and a lack of sustained interest in methane-oxidizing bacteria, information is still woefully scant on their taxonomic position and physiology.

Although most workers credit *Methanomonas methanica* as being the principal, if not the only, species to oxidize methane, there is some evidence that other bacteria utilize methane. *Pseudomonas fluorescens* was identified by Aiyer (1) as the bacterium responsible for the oxidation of methane in swamp paddy soil. Hutton (82) recorded that a species of *Methanomas* quite unlike *M. methanica*, as well as certain strains of *Pseudomonas fluorescens*, utilized methane. The methane-oxidizing cultures of Münz (119) frequently contained *P. fluorescens* and/or *P. aeruginosa*, but, since pure cultures of neither could utilize methane, he concluded that they grew at the expense of the organic matter synthesized by methane bacteria. Münz regarded it as doubt-

ful whether the species of methane bacteria with which he worked was the same species described by earlier workers (101,156).

There is disagreement among investigators and a general lack of data as to whether *Methanomonas methanica* can also utilize higher hydrocarbons. The methane oxidizer studied by Münz (118) was said to utilize neither ethane nor ethylene, but the "methane bacterium" of Tausz and Donath (196) oxidized hydrogen, ethane, propane, butane, and higher paraffin hydrocarbons as well as methane, which may cause one to wonder if their culture was pure. Certain methane oxidizers believed by Hutton (82) to be pure cultures were found to assimilate ethane and propane. Be this as it may, it is generally easier to demonstrate the oxidation of ethane and higher hydrocarbons than methane by mixed cultures of soil bacteria in spite of the more common occurrence of methane.

A strain of *M. methanica*, studied by Slavina (155b), utilized methane, ethane, and propane. All except 8 out of 342 cultures of methane-oxidizing bacteria isolated from oil fields by Slavina (155a) gave a positive test for peroxidase, as indicated by a blue color when treated with guaiacol and hydrogen peroxide.

The so-called geomicrobiological prospecting methods of Blau (15), Mogilevskii (115), Sanderson (143), Taggart (177,178,180), and others are based upon the presence or activities of bacteria which oxidize gaseous hydrocarbons in surface soil overlying subterranean deposits of petroleum. Geochemical methods must take into consideration the rapidity with which bacteria may oxidize hydrocarbons in soil samples during their transportation and storage (115,235).

The catalytic or chemical oxidation of methane generally results in the formation of methyl alcohol, formaldehyde, formic acid, and carbon dioxide, in the order named, although hydrogen, carbon, carbon monoxide, alcohols, aldehydes, acetone, acids, saturated and unsaturated hydrocarbons, resins, and other products may be formed, depending upon the conditions (40). No sustained effort has been made to detect any of these products except carbon dioxide in cultures of methane-oxidizing bacteria and the same must be said regarding the utilization of the theoretical intermediate products of oxidation.

Bacterium hidium, isolated from medicinal mud by Goobin (58), oxidized kerosene and ethane, but no mention was made of its ability to attack methane or other gaseous hydrocarbons. Acetylene but not ethylene, propylene, or methane provided the energy and carbon re-

quirements for the growth of *Mycobacterium lacticola* (13). Ethylene stimulated the respiration of *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, and *A. niger*, although a high concentration of ethylene retarded the growth of these molds (208).

In their review of the fragmentary literature on the microbial oxidation of gaseous hydrocarbons, Eglhoff and Schaad (40) pointed out the need of investigations on the action of bacteria on ethane, propane, butanes, 2,2-dimethylpropane and allied compounds.

VI. Relative Oxidizability of Different Classes of Hydrocarbons

A. ALIPHATIC VS. AROMATIC COMPOUNDS

A few generalizations regarding the relative oxidizability of different classes of hydrocarbons seem to be warranted, after discounting differences attributable either to the specificity of hydrocarbonoclastic enzymes of various microorganisms or to the degree of dispersion or solubility of hydrocarbons in the nutrient medium. In general, aliphatic or paraffinic hydrocarbons are attacked more rapidly and by more microbial species than aromatic compounds. It is a commonly reported observation that organisms which assimilate aromatic or naphthenic hydrocarbons attack the corresponding aliphatic compound more readily, and there are many reports of the inability of aliphatic hydrocarbon oxidizers to attack cyclic compounds; for example, neither benzene nor xylene was attacked by *Actinomyces oligocarbophilus* (105), which assimilated aliphatic hydrocarbons.

Petroleum fractions high in paraffinic hydrocarbons were reported by Stone *et al.* (170) to be more readily assimilated by soil microorganisms than those of high aromatic content, while the naphthenic fractions occupied an intermediate position.

After noting that *Bacterium aliphaticum* quantitatively decomposed aliphatic hydrocarbons ranging from C_6H_{14} to $C_{34}H_{70}$ but failed to attack benzene, toluene, xylene, or other aromatic or naphthenic hydrocarbons, Tausz and Peter (197) suggested that such bacteria be employed for freeing cyclic hydrocarbons from aliphatic compounds. When grown in mixtures of hydrocarbons, *Bacterium aliphaticum liquefaciens* quantitatively decomposed both aliphatic and naphthenic hydrocarbons and left all aromatic hydrocarbons unaltered. Among the naphthenic hydrocarbons shown to be attacked by this organism were cyclohexane, methylcyclohexane, 1,3-dimethylcyclohexane and 1,3,4-trimethylcyclohexane (197).

After observing that *Pseudomonas fluorescens* and *Bacterium aliphaticum* readily attacked higher aliphatic hydrocarbons but not benzene, toluene, xylene, or short-chain aliphatic hydrocarbons, Johnson *et al.* (97) pondered whether hydrocarbons which are powerful fat solvents may be less readily assimilated than those which are less likely to dissolve cell lipides.

Whether the greater susceptibility of aliphatic hydrocarbons to microbial attack is attributable to physical properties or chemical configuration is not known, but aromatic hydrocarbons are attacked by a good many microorganisms. *Bacillus hexacarbovorum* (171), *Bacterium benzoli* (124), and *Bacillus toluolicum* (189) assimilated benzene, toluene, and xylene in concentrations up to one part in 10,000 of mineral media. The occurrence in soil of bacteria which decompose benzene, toluene, naphthalene, or other aromatic compounds has been reported by Gray and Thornton (61), Jacobs (89), Matthews (112), Sen Gupta (151), Tattersfield (181), and Wackenhut (214).

From oil-soaked soil Tausson isolated *Bacterium naphthalenicus*, *Bacillus naphthalenicus liquefaciens*, and *B. naphthalenicus non-liquefaciens* which assimilated naphthalene (181) and *B. phenanthrenicus bakiensis* and *B. phenanthrenicus guricus* which assimilated phenanthrene (188). ZoBell *et al.* (234) isolated from marine sediments bacteria which oxidized benzene, toluene, xylene, naphthalene, and anthracene, though none as readily as paraffinic hydrocarbons of comparable molecular weight. Several species of *Micromonospora* isolated from lake mud by Erikson (45) oxidized toluene and naphthalene.

Enrichment cultures of soil bacteria studied by Strawinski and Stone (173) attacked naphthalene, biphenyl, tetralin, decalin, and butylbenzene, but not nearly as readily as aliphatic hydrocarbons. The ability of anaerobic sulfate reducers to assimilate hydrocarbons is restricted primarily to aliphatic compounds (125,139), although aromatic hydrocarbons are slowly attacked by certain strains (194,227, 235).

B. EFFECT OF CHAIN LENGTH ON OXIDIZABILITY OF HYDROCARBONS

As a rule long-chain hydrocarbons are attacked more readily and by more microbial species than those of low molecular weight. When similarly dispersed throughout the medium to compensate for differ-

ences in solubility, the susceptibility of petroleum products to microbial oxidation generally increases with the melting or boiling point. Mixed microflora from soil or sediments ordinarily attack petroleum ether more readily than natural gas, and oxidized with increasing ease are gasoline, kerosene, lubricating oil, and paraffin wax, in the order named (19,68,97,158,234).

Several *Mycobacterium* species observed by Haas *et al.* (68) grew on paraffin wax much better than on gasoline or kerosene. Most of the *Pseudomonas* species also grew better on paraffin wax and oils than on kerosene and better on kerosene than on gasoline, although one *Pseudomonas* species grew on petroleum ether, gasoline, and kerosene but on neither paraffin wax nor oil.

Most of the 16 species of *Mycobacterium* and *Pseudomonas* isolated from soil and ditch water by Söhngen (158) assimilated hydrocarbons having boiling points higher than 150°C. but not those with lower boiling points. *Micrococcus paraffinae*, like *Mycobacterium album*, *M. rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, and certain raw cultures, rapidly oxidized finely divided paraffin wax, but all grew less readily on pentane, hexane, heptane, and octane than on higher members of the series. These organisms failed to attack hydrocarbons having fewer than five carbon atoms per molecule.

Cultures of *Bacterium aliphaticum* and *B. aliphaticum liquefaciens* attacked all aliphatic hydrocarbons tested ranging from pentane, C_5H_{12} , to tetratriacontane, $C_{34}H_{70}$, but no hydrocarbon lower than pentane was attacked by either organism (195,197). Unlike other investigators (82,118), who have found a high degree of specificity in the ability of methane oxidizers to oxidize only methane, Tausz and Donath (196) reported that their "methane bacterium" also utilized ethane, propane, butane, pentane, hexane, and higher hydrocarbons with increasing ease. The "paraffin bacterium" of Tausz and Peter (197), probably a *Pseudomonas*, attacked no aliphatic hydrocarbon lower than hexadecane, $C_{16}H_{34}$, but it attacked with increasing ease higher members of the paraffin series.

In the hands of Johnson *et al.* (97), *Bacterium aliphaticum* and *Pseudomonas fluorescens* grew with increasing ease on gasoline, kerosene, lubricating oil, and paraffin oil. *P. fluorescens* grew on no pure hydrocarbon of shorter chain length than dodecane, $C_{12}H_{26}$, but *B. aliphaticum* grew better on hexane, heptane, octane, and nonane than on dodecane.

Strawinski's (172) observations on the action of mixed soil microflora on 24 different hydrocarbons indicated that the longer the aliphatic portion of either paraffinic or mononuclear aromatic compounds, the more readily they are dissimilated. Hexadecane was oxidized more readily than any other compound tested. The observation of Stone *et al.* (169) that medium-weight petroleum fractions are more susceptible to microbial attack than the heavier fractions may be attributable to the chain length of the hydrocarbons, the kinds of hydrocarbons present in the various fractions, or the degree of dispersion of the hydrocarbons in the mineral medium. Rahn (133) reported that soil fungi grew better on paraffin wax having a melting point of 45° than on that melting at 56°C. Similarly, Hopkins and Chibnall (79) noted that *Aspergillus versicolor* showed good growth on *n*-tricosane, C₂₃H₄₈, fair growth on *n*-heptacosane, C₂₇H₅₆, *n*-nonacosane, C₂₈H₆₀, and *n*-triacontane, C₃₀H₆₂, slight growth on *n*-tetratriacontane, C₃₄H₇₀, and no growth on *n*-pentatriacontane, C₃₅H₇₂.

According to Tausson and Aleshina (191), anaerobic sulfate-reducing bacteria can utilize no paraffinic molecule smaller than decane. Confirming this assertion, which was based upon theoretical thermodynamic considerations, Novelli and ZoBell (126) actually observed the utilization by sulfate reducers with increasing ease of decane, C₁₀H₂₂, tetradecane, C₁₄H₃₀, eicosane, C₂₀H₄₂, docosane, C₂₂H₄₆, and hentriacontane, C₃₁H₆₄.

C. EFFECT OF UNSATURATION OR DOUBLE BONDS

Hydrocarbons having double bonds seem to be more susceptible to microbial oxidation than their saturated counterparts. Haag (65) came to this conclusion after observing that *Mycobacterium* species utilized pentene, C₅H₁₀, but not pentane, C₅H₁₂, and mixtures of hydrocarbons having high iodine numbers. For example, carbon dioxide was produced from the oxidation of a paraffin having an iodine number of 4.6 at an average rate of 103 mg. per week as compared with 32 mg. of carbon dioxide per week from a paraffin having an iodine number of 2.4. Seven other paraffins having intermediate iodine numbers were oxidized at intermediate rates corresponding to their degrees of unsaturation.

When lubricating oils were subjected to the action of bacteria, a decrease in the iodine number suggested to Tausson and Shapiro (192) that unsaturated hydrocarbons are preferentially attacked.

Desulfovibrio species were found by ZoBell *et al.* (235) to oxidize hexadecene, $C_{16}H_{32}$, appreciably faster than its saturated homolog, hexadecane, $C_{16}H_{34}$. Butadiene, $CH_2=CH-CH=CH_2$, isoprene or methylbutadiene, $CH_2=CH-C(CH_3)=CH_2$, isobutylene, $(CH_3)_2C=CH_2$, styrene, $C_6H_5-CH=CH_2$, and allied unsaturated "rubber" hydrocarbons have been shown to be very vulnerable to microbial attack (23).

Although the methane bacteria investigated by Münz (118) failed to attack ethylene, unidentified species in mixed cultures formed films or pellicles on the surface of water through which ethylene was bubbled. The "methane bacterium" of Tausz and Donath (196) utilized ethylene, propylene, and butylene more readily than methane or ethane.

Two different cultures studied by Tausz and Peter (197) grew better on octene, C_8H_{16} , than on octane, C_8H_{18} , an observation which has been confirmed by Strawinski (172) with mixed cultures of soil bacteria. The position of the double bond may also influence the results as indicated by the fact that *n*-pentene, $CH_2=CHCH_2CH_2CH_3$, supported the growth of mixed cultures of soil bacteria much better than pentene-2, $CH_3CH=CHCH_2CH_3$ (172).

In the cyclic series there seems to be no consistent relationship between the presence of double bonds and the oxidizability of hydrocarbons by microorganisms. Naphthalene, which has five double bonds, was utilized more readily by soil bacteria than its completely saturated counterpart, decalin, but, conversely, benzene, which has three double bonds, was utilized less readily than its completely saturated counterpart, cyclohexane (172).

Two enrichment cultures of marine bacteria which oxidized ethane, H_3C-CH_3 , were found to utilize ethylene, $H_2C=CH_2$, more rapidly, and they attacked acetylene, $HC\equiv CH$, more rapidly, than either ethane or ethylene (235). The susceptibility of such unsaturated compounds to microbial attack may help to account for the general absence of olefinic hydrocarbons in petroleum. In this connection it is of interest to point out that certain hydrogenase-producing anaerobes have been observed to activate the hydrogenation or saturation of octene and hexadecene.

D. EFFECT OF BRANCHING OR SIDE CHAINS

Although there are many exceptions to the rule due to unpredictable enzyme specificity of hydrocarbonoclastic microorganisms, in general

iso or branched-chain hydrocarbons are more susceptible to microbial oxidation than normal or straight-chain compounds. For example, isooctane or 2,2,4-trimethylpentane, $\text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$, was utilized much more rapidly than *n*-octane, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$, by mixed cultures of soil (172) and marine (223,235) bacteria, although the reverse relationship has been reported for certain organisms (97,173).

The growth of *Bacterium aliphaticum liquefaciens* was supported by cetylbenzene, $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_{16}\text{H}_{33}$, but not by either benzene, C_6H_6 , or toluene, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (196). This same organism oxidized dimethylcyclohexane, $\text{C}_6\text{H}_{10}(\text{CH}_3)_2$, and trimethylcyclohexane, $\text{C}_6\text{H}_9(\text{CH}_3)_3$, more rapidly than cyclohexane, C_6H_{12} (197).

Matthews (112) claimed that the introduction of a methyl group into the benzene ring rendered the resulting compound more susceptible to bacterial oxidation because of the greater potential energy, ΔH , of the methylated compound. Thus toluene, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$, was found to cause a greater increase in the bacterial population when added to soil than benzene, xylene, $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)_2$, greater than toluene, and mesitylene, $\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)_3$, greater than xylene. Similarly, Wagner (215) found that *Bacterium benzoli* utilized either toluene or xylene more readily than benzene. Soil bacteria studied by Strawinski and Stone (173) grew fairly well on butylbenzene, $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_4\text{H}_9$, but not at all on either benzene or toluene. Mixed microflora from soil utilized toluene more readily than benzene or *m*-xylene (186). One of the four strains of *Bacillus toluolicum* observed by Tausson (188) utilized ethylbenzene, $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_2\text{H}_5$, and toluene more readily than benzene, but the reverse relationship was found for the other three strains. Pseudocumene, cumene, and *p*-thymol were attacked only very slowly by *B. toluolicum*.

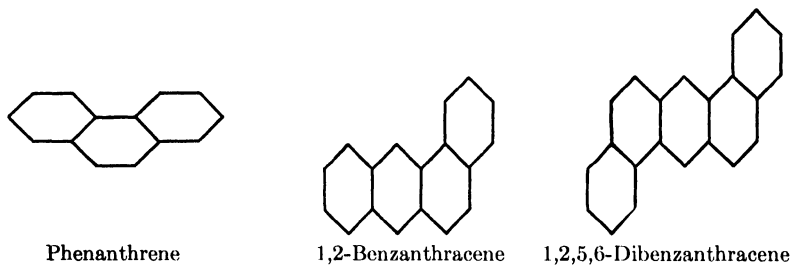
The addition of a methyl group to naphthalene was found by Strawinski (172) to reduce the availability of the resultant compound to microbial attack by soil bacteria.

E. POLYCYCLIC HYDROCARBONS

Most investigators have found that naphthalene is dissimilated more readily and by more microbial species than benzene, but only fragmentary data are available on the microbial oxidizability of anthracene and more complex hydrocarbons having condensed benzene nuclei. When added to soil, naphthalene generally causes a greater

increase in the bacterial population than benzene (61,89,109,112,181). Strawinski and Stone (173) found no bacteria in soil enrichment cultures which were capable of growing on benzene, although both naphthalene and biphenyl supported large bacterial populations.

According to Tausson (186,189), naphthalene, biphenyl, anthracene, and phenanthrene are readily utilized by many soil bacteria. Certain sulfate-reducing bacteria (194) slowly attacked naphthalene, phenanthrene, and retene (7-isopropyl-1-methylphenanthrene). Tausson described three new species which assimilated naphthalene (185) and two which assimilated phenanthrene (188). From Maikopsy soils Tausson obtained cultures which oxidized acenaphthene, anthracene, bibenzyl, biphenyl, diphenylmethane, fluorene, and stilbene. Sisler and ZoBell (154) noted that phenanthrene and anthracene were assimilated by marine bacteria somewhat faster than either naphthalene or 1,2-benzanthracene, but 1,2,5,6-dibenzanthracene was assimilated only about one fourth as fast.



From oil-field soils Osnitskaya (128) cultivated mixed microflora which utilized naphthenic acids as the sole source of carbon. The destruction of naphthenic acids was accompanied by an increase in the iodine number and a decrease in the acid number. *Pseudomonas oleovorans* and large numbers of other bacteria found growing in cutting oils were believed by Lee and Chandler (107) to live on naphthenic acids in the oils.

VII. Action of Microorganisms on Hydrocarbon Derivatives

The decomposition of phenol and *o*-, *m*-, and *p*-cresol by soil bacteria was first demonstrated by Störmer (171) in 1907. Six years later Perrier (130) described several species of *Penicillium*, *Mucor*, *Torula*, yeasts, and bacteria, including four varieties of *Bacillus benzoicus*,

which decomposed phenol, salicylic acid, and benzoate as the sole source of carbon and energy.

From sewage Fowler *et al.* (50) isolated *Flavobacterium helvolum*, which destroyed 0.1% phenol in mineral medium. Kalabina and Rogovskaya (99) studied sewage bacteria which utilized phenol in concentrations as high as 0.3%. Other phenol-oxidizing bacteria have been found in soil (9,29,47,61,151,155,210), lake mud (45), effluent from a coke-benzene plant (41,42), and in marine sediments (235).

Most of the ten strains of *Micromonospora*, which Erikson (45) isolated from lake mud, assimilated phenol, *m*-cresol, β -naphthol, resorcinol, trinitroresorcinol, picric acid, and *p*-dichlorobenzene, as well as toluene and naphthalene. Moore (116) observed *Proactinomyces* species from soil which utilized pyridine, aniline, nitrobenzene, and phenol as the sole source of energy.

Buddin (17) noted a great increase in the bacterial population of soil treated with phenol, cresol, quinone, hydroquinone, and pyridine, as well as with certain paraffinic, aromatic, or naphthenic hydrocarbons, but it remained for Matthews (112) to prove that these substances were oxidized by bacteria. Matthews also demonstrated the microbial utilization of chlorobenzenes and nitrobenzenes. Gray and Thornton (60,61) described several species of soil bacteria which could oxidize phenol, cresol, resorcinol, phloroglucinol, toluene, or naphthalene.

Phenol was decomposed by five different strains of *Achromobacter* species studied by Czekalowski and Skarzynski (29,155). Utilized in the order of decreasing ease by one strain of *Achromobacter* were hydroxybenzoate, dihydroxybenzoate, benzoate, phenyl acetate, phenyl benzoate, *o*-cresol, diphenylacetate, benzyl alcohol, *o*-aminobenzoate, phenol, phenyl sulfate, orcinol, *m*-cresol, *p*-cresol, *o*-aminobenzoate, pyrogallol, benzamide, cyclohexanol, and *m*-dihydroxybenzene. Not attacked were several closely related aromatic compounds, including *p*-dihydroxybenzene, nitrobenzene, aminobenzene, benzil, naphthol, and phthalic acid. The specificity of the attack is illustrated by the fact that 3,4-xylene-1-ol was readily utilized but 3,5-xylene-1-ol was not attacked; *o*-diphenol (catechol) was readily utilized but *p*-diphenol (hydroquinone) was not attacked by the *Achromobacter* strain. The highly specific enzyme system responsible for the breakdown of aromatic compounds was believed to contain esterases.

Benzoate was utilized by nearly all strains of *Pseudomonas* examined by Stanier (165), but phenol was utilized by only three out of 22 strains tested. Only one strain attacked *o*- and *m*-hydroxybenzoate, while 21 strains attacked *p*-hydroxybenzoate. Benzaldehyde was attacked by 20 strains, benzyl alcohol by 17, and phenyl acetate by 14 strains. The attack of all such aromatic compounds was believed to be brought about by highly specific adaptive enzymes.

Three species of phenanthrene-decomposing bacteria, *Bacillus phenanthrenicus bakiensis*, *B. phenanthrenicus guricus*, and *Bacterium phenanthrenicum*, were found by Tausson (188) to attack saligenin, *o*-salicylic acid, *o*-hydroxybenzaldehyde, pyrocatechol, and quinic acid. Two species utilized hydroquinone and one species utilized phenol. Resorcinol, phloroglucinol, pyrogallol, and phthalic acid were not attacked.

VIII. Products of Hydrocarbon Oxidation

Very little is known regarding the mechanism by which hydrocarbons are attacked by microorganisms. It is generally agreed, however, that carbon dioxide and cell substance are the principal products resulting from the microbial dissimilation of hydrocarbons. Organic acids, ketones, alcohols, aldehydes, and modified hydrocarbons have also been detected as intermediate or end products.

A. CELL SUBSTANCE

An appreciable percentage of the hydrocarbon dissimilated by microorganisms may be converted into microbial protoplasm or cell substance, particularly during the early stages of incubation. From the number and mass of bacteria developing in mineral media enriched with hydrocarbons as the sole source of carbon, ZoBell (226,235) estimated that from 25 to 35% of the carbon content of paraffinic hydrocarbons appeared as bacterial protoplasm. Comparable findings for mold fungi have been reported by Tausson (187), who reported results in terms of an "economic coefficient":

$$E = \frac{(\text{weight of mold mycelium})}{(\text{weight of HC utilized})} \times 100$$

The economic coefficient resulting from the growth of *Aspergillus flavus* on paraffin wax ranged from 52.3 to 92.5, the highest values

being found during the early stages of incubation. These values may be compared with economic coefficients of 35.1 to 39.2 for beeswax and 26 to 28 for glucose.

The amount of organic matter, probably cell substance, produced by methane-oxidizing bacteria was determined by Söhngen (156,157) and Münz (118,119) as a criterion of activity. Aiyer and associates (1,72) like Giglioli and Masoni (54,55) considered organic matter formation one of the most important functions of methane oxidizers in soil. Harper (71) noted a marked increase in the organic content of soil around leaky gas mains, presumably due to the bacterial oxidation of methane and other hydrocarbons. Schollenberger (145) also observed increased biological activity in soil resulting from leaking natural gas.

B CARBON DIOXIDE

Söhngen (158) observed the development of bacteria and the formation of insignificant quantities of organic acids during the dissimilation of higher paraffins, but the principal products were carbon dioxide and water. Tausz and Peter (197) came to the same conclusion after comparing the quantity of carbon dioxide produced with the amount of oxygen consumed by bacteria decomposing hydrocarbons. The relatively high R.Q. values observed by others (19,96,97,169,170) for the oxidation of hydrocarbons have already been mentioned.

Although Wagner (215) obtained indirect evidence for the formation of hydroquinone and various organic acids, carbon dioxide was the principal product resulting from the oxidation of benzene and toluene by *Bacterium benzoli*.

Büttner (20) accounted for from 80 to 90% of the carbon in paraffin dissimilated by soil microbes as carbon dioxide, the remainder appearing as cell substance, fatty acids, and lesser quantities of other intermediate products. His values, however, for the amount of cell substance formed are probably too low because in determining the former, Büttner extracted the cultures with carbon tetrachloride which could be expected to dissolve cell lipides and other products besides paraffin wax. The acid-fast bacteria with which he was working might have contained appreciable quantities of lipides.

Approaching the problem from the viewpoint of the biological purification of sewage and other waste waters, Isjurova (87) showed that in the presence of appropriate nutrients and oxygen various kinds of

hydrocarbons were almost quantitatively oxidized to carbon dioxide and water.

C. ORGANIC ACIDS

Tausson (186,187) questioned the formation of free fatty acids by *Aspergillus flavus* because of the ease with which such products are attacked by the mold, and, moreover, he observed no increase in acidity of mineral medium in which paraffin was being decomposed. Nonacidic products detected in appreciable amounts in cultures of fungi growing on paraffin wax were assumed by Tausson (183,184) to consist in part of esters of fatty acids and higher alcohols.

Increases in the saponification number and the emulsification of crude oil undergoing microbial decomposition were attributed by Tausson and Shapiro (192) to the formation of fatty and naphthenic acids. The emulsification of the unfermented part of the oil and the decrease in the pH of the medium also indicated to Bushnell and Haas (19) and to Stone *et al.* (170) that paraffinic hydrocarbons were dissimilated with the formation of long-chain fatty acids.

According to Strawinski (172), the bacterial oxidation of cetane and naphthalene resulted in a more acid reaction than could be accounted for upon a basis of the amount of carbonic acid produced. Significant quantities of *o*-salicylic acid were detected in naphthalene cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. Soil bacteria studied by Jacobs (89) formed phthalic acid from naphthalene.

T. A. Tausson (182) claimed that fatty acids and carbon dioxide were produced from paraffin by certain yeasts. The microbial formation of traces of acetic and lactic acids from kerosene was reported by Thaysen (200). A patent issued to Taggart (179) disclosed a bacterial method for converting gaseous paraffinic hydrocarbons into waxy acids, low boiling point alcohols, and esters.

Haas *et al.* (68) isolated small quantities of organic acids, having melting points ranging from 25 to 30°C., from bacterial cultures growing on mineral oil. Acid formation by *Pseudomonas aeruginosa* from petroleum, heptane, gasoline, and petroleum jelly was observed by Imelik (84). Formic and valeric acids were identified in cultures growing on cyclohexane (85).

The oxidation of benzene to muconic acid in experimental animals has been reported (11,90,122,201). There is also evidence that animals oxidize toluene to benzoic acid (213). Stetten (168) adminis-

tered hexadecane tagged with heavy hydrogen to prove that rats can oxidize this hydrocarbon to fatty acids.

D. ALDEHYDES

Imelik (85) detected formaldehyde in cultures of *P. aeruginosa* assimilating cyclohexane. The formation of aldehydes by *Pseudomonas* species dissimilating naphthalene was suspected by Strawinski (172). Acetaldehyde has been reported as an intermediate product in the microbial oxidation of kerosene (200) and acetylene (13).

E. ALCOHOLS AND OXYPHENOLS

A volatile alcohol, thought to be isopropanol, as well as glycol and glycerol were produced from paraffin oil by soil microflora observed by Haas (66). Molds growing in mineral oil medium produced small amounts of ergosterol and cholesterol, but no sterols were found in bacterial cultures acting on oil (68). Certain fungi studied by Tausson (184) were believed to form higher alcohols during the dissimilation of paraffin wax.

In an effort to learn how higher paraffins are oxidized by molds, Hopkins and Chibnall (79) experimented with oxygenated derivatives of the hydrocarbons. Ketone derivatives, such as 14-heptacosanone $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$, and 16-hentriacontanone, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$, were utilized more readily than the corresponding hydrocarbons, *n*-heptacosane, $\text{C}_{27}\text{H}_{56}$, and hentriacontane, $\text{C}_{31}\text{H}_{64}$, but the secondary alcohols, 14-heptacosanol, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CHOH}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$, and 16-hentriacontanol, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CHOH}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$, were not utilized. From such experiments it was concluded that the primary products of oxidation of paraffinic hydrocarbons are ketones or possibly polyketones which are oxidized further to shorter fatty acids and then to carbon dioxide as fast as formed. The intermediate formation of alcohols or esters, of fatty acids and alcohols was questioned, although there is ample evidence that hydroxy compounds, including phenols, are readily attacked by many microorganisms. As a matter of fact, the oxidizability of compounds seems to increase with an increase in the number of carbon atoms which are linked with hydroxy, carboxy, or keto groups (128).

After observing that cyclohexanol was dissimilated by *Pseudomonas aeruginosa* in the same fashion as cyclohexane, Imelik (85) postulated

The inability of the bacteria to utilize any of the following closely related compounds indicated to Tausson that none of them is an intermediate product in the oxidation of phenanthrene because the latter was oxidized completely to carbon dioxide and water: resorcinol, phloroglucinol, pyrogallol, and phthalic acid.

Judging from the observed inability of *Bacterium naphthalinicum* and two other allied naphthalene-decomposing bacteria to attack pyrocatechol, resorcinol, phloroglucinol, pyrogallol, phthalic acid, α -naphthol, or β -naphthol, Tausson (185) concluded that none of these compounds could be intermediate products in the dissimilation of naphthalene. He postulated, but failed to prove, that both benzene rings in the naphthalene molecule are ruptured simultaneously by bacteria. As has already been pointed out, however, certain bacteria have been demonstrated to produce *o*-salicylic acid (172) and phthalic acid (89) from the dissimilation of naphthalene, which again emphasizes differences attributable to enzyme specificity or to experimental conditions.

Unlike the anaerobic degradation of phenanthrene by sulfate-reducing bacteria which resulted in the formation of oxyphenol compounds, no such intermediate products were observed by Tausson and Vesselov (194) during the anaerobic degradation of naphthalene.

Von Oettingen (213) has reviewed the literature on the oxidation of benzene to polyphenols by experimental animals (see p. 476).

F. MODIFIED HYDROCARBONS AND PIGMENTS

From the observation that hydrogen was transferred from paraffinic hydrocarbons to methylene blue, as in a modified Wieland reaction, Tausz and Donath (196) conjectured that unsaturated hydrocarbons were formed by bacteria. The appearance of unsaturated hydrocarbons in kerosene cultures was attributed by Bushnell and Haas (19) to the dehydrogenating action of bacteria. Imelik (83) attributed an increase in the bromine index of petroleum being acted on by soil bacteria to the conversion of saturated hydrocarbons into unsaturated ones, but other workers (65,192) have presented evidence that unsaturated hydrocarbons are preferentially attacked (see p. 459).

In the gas phase of bacterial cultures growing on kerosene Thaysen (199) found 10.55% methane and 3.95% ethane. He credited microbial activity in water bottoms of kerosene storage tanks with being responsible for the production of explosive gas mixtures. ZoBell *et al.*

(235) have confirmed the liberation of volatile hydrocarbons, definitely methane and possibly traces of ethane, from paraffin oil being decomposed by marine bacteria. Rubber-digesting bacteria observed by Söhngen and Fol (160) split methane from caoutchouc.

Upon a basis of theoretical thermodynamic considerations and the interpretation of laboratory observations, Tausson and Aleshina (191) postulated that the general tendency is for anaerobic sulfate-reducing bacteria to convert paraffinic hydrocarbons into polymethylene or naphthenic hydrocarbons, for example:



Unquestionably sulfate reducers do modify paraffinic hydrocarbons with the formation of a minimum of oxygenated carbon compounds, but virtually nothing is known regarding the chemical composition of the end products (235).

An unsaturated pigmented hydrocarbon, β -carotene was produced from paraffin oil by *Corynebacterium* species studied by Haas *et al.* (66,68). Two other carotenoid pigments and astacin were produced from paraffin oil by *Mycobacterium* species (67). Imelik (85) identified as hemipyocyanin the pigment produced by *Pseudomonas aeruginosa* during the decomposition of cyclohexane. Microorganisms growing on various kinds of hydrocarbons often produce pigments which impart a yellow, orange, red, brown, or other color to the medium. According to Slavina (155b), certain hydrocarbon-oxidizing bacteria produced a brilliant green fluorescence by which they could be distinguished from closely allied species.

IX. Microbial Modification of Petroleum and Its Products

Petroleum may be modified wherever it occurs in contact with water under conditions favorable for microbial activity. The extent and character of the changes will be influenced primarily by the surface area of oil exposed to microbial enzymes, the kinds of organisms present, chemical composition of the oil, the environmental conditions, and time. The accumulation of oil in droplets or larger masses and its burial in sediments tend to protect it from contact with water or oxygen, thereby greatly retarding its destruction, but even in subterranean pools petroleum may be slowly attacked by anaerobic bacteria at the oil-water interface. Probably only in those environments where microbial activity is prevented by adverse $p\text{H}$, low E_h , toxic

elements, antibiotics, lack of moisture or nutrients, enzyme inhibitors, or other unfavorable conditions is petroleum completely immune from microbial attack. Cyanide and urethane may be mentioned as examples of enzyme inhibitors which stopped the action of *Bacterium aliphaticum* on hydrocarbons (97), and there may be other types of enzyme inhibitors occurring naturally in sediments.

A. RATE OF OXIDATION OF OIL

Wagner (215) reported the destruction of crude oil by *Bacterium benzoli* at a rate exceeding 100 mg. per day in 100 cc. of mineral solution overlaid with oil. Layers of crude oil up to 2 mm. in thickness floating on mineral medium were perforated by bacteria within a week or two, after which the oil gradually disappeared, but layers thicker than 2 mm. were not noticeably affected by bacteria owing to a lack of free oxygen, according to Tausz and Peter (197).

Russian and American crude oils examined by Söhngen (158) were destroyed by soil aerobes at a rate as high as 0.75 g. of oil per day per square meter of oil surface exposed to the culture. In experiments of seven months' duration, Tausson and Shapiro (192) observed the bacterial destruction of crude and lubricating oils at rates ranging from 0.4 to 1.2 g. per day per square meter. From data given by Tausson (187), it is calculated that enrichment cultures of soil bacteria oxidized paraffin wax having a melting point of 78°C. at a rate of 1.93 g. per day per square meter. Naphthalene was oxidized as fast as 3.37 g. per day per square meter (185).

Mixed cultures of aerobic soil and marine microorganisms studied at the Scripps Institution (235) destroyed crude oils from nearly one hundred different fields at rates ranging from 0.03 to 0.5 g. per day per square meter. Approximately one gram of oil was accurately weighed into 100 cc. of inoculated mineral medium in glass bottles which gave an oil-water interfacial area of approximately 60 square centimeters. After 3 to 14 months' incubation at 28°C. the loss of oil attributable to microbial activity was determined by careful comparison with uninoculated controls.

The rate of oil oxidation could be greatly accelerated by dispersing the oil throughout the medium by emulsification or by absorption on particles of calcium carbonate, silica sand, diatomaceous earth, or other finely divided solids. Such dispersion of the oil also provided for more rapid multiplication of microorganisms. During the period

of logarithmic increase it is estimated that aerobic bacteria destroyed oil at the rate of $4 \text{ to } 318 \times 10^{-13}$ mg. per cell per hour at 28°C .

B. EXTENT OF CHANGE

Thick layers of oil may be affected so slowly by microbial action that the only evidence of attack is to be found in the juxtaposed water phase (increased bacterial population, reduced oxygen content, lowered $p\text{H}$, etc.). At the other extreme, oil in thin films on water or soil may be quantitatively oxidized to carbon dioxide and water.

The complete disappearance of crude oil from the water and beaches of San Francisco Bay following the wrecking of a tanker was shown by Beckman (10) to be due largely to bacterial action. In swamps where mosquito control presents a problem, Headlee and Miller (74) noted the destruction of films of oil attributable to microbial activity. Layers of oil 0.1 to 0.2 mm. thick placed on marshes and reservoirs to control mosquitoes were observed by Tausson (186) to be emulsified, perforated, and oxidized by bacteria in 7 to 10 days in the summer. When absorbed on small pieces of pumice to provide for better contact with bacteria or their enzymes, oil was decomposed much faster than were films of oil floating on the water.

The turbidity of mineral medium inoculated with soil bacteria and covered with a layer of heavy black Baku crude oil 1 to 5 mm. thick was observed by Tausson (187) to increase gradually due to the multiplication of bacteria and the emulsification of oil. Often the medium became discolored yellow or brown and a bacterial pellicle formed at the oil-water interface. After 4 days there was evidence of emulsification which increased until the layer of oil was perforated in places and, within 10 to 18 days, the layer of oil was broken into islands. After three weeks only a semisolid sticky resinous residue remained.

Examples of the disappearance of oil from surface soil as a direct result of microbial activity have been chronicled by Baldwin (7), Carr (21), Osnitskaya (128), and Tausson (186). The disappearance within a few days of crude oil, stove oil, or other petroleum products sprayed on soil or trees to kill weeds or insects must be due to hydrocarbon-oxidizing microorganisms.

Oil in subterranean deposits may have been modified by microorganisms throughout the geological ages. Although there is no conclusive evidence for such change, the occurrence of living bacteria at appreciable depths in petroliferous sediments (190,225) is highly sug-

gestive. Ginsburg-Karagitscheva (57) has reported the presence of living bacteria in Tertiary formations, and the general absence of sulfates in certain formations indicates the activity of sulfate-reducing bacteria (56). Such bacteria were credited by Rogers (137) with depleting sulfates and contributing to the conversion of paraffinic hydrocarbons into naphthenic compounds. This function has been attributed to certain sulfate-reducing bacteria by Tausson and Aleshina (191). The possibilities of sulfate reducers modifying petroleum at the oil-water interface have been discussed by Baier (6), Schwartz and Müller (148), and ZoBell (230). Laboratory experiments have shown that bacteria alter the properties of crude oil in various ways (20,21,83,158,192,195,235).

Various ways in which bacteria may contribute to the release of crude oil from oil-bearing sediments have been outlined by ZoBell (228-230).

C. PETROLEUM PRODUCTS

The microbial modification of kerosene, gasoline, and other distillation products of petroleum has been reported by several investigators (19,20,58,97,158,189,192,196,214,221,223,234). An increase in the hydrogen sulfide content of natural gas was attributed by Kegel (102) to the activities of hydrocarbon-oxidizing bacteria in the sulfate-containing waters of trickling gas coolers. Hasemann (73) studied the decomposition of illuminating gas by bacteria.

Discoloration and the formation of gummy substances in gasoline and kerosene were shown by Haas (66) to result from the action of bacteria under certain conditions. Diesel fuels, lubricating oils, and paraffin oils were also attacked when stored in contact with water. Bacteria found by Thaysen (199) in the water bottoms of gasoline and kerosene storage tanks helped to account for the deterioration of these distillates, the formation of hydrogen sulfide, and the corrosion of metal tanks. Thin layers of kerosene on water containing soil bacteria became discolored and gradually disappeared, according to Tausson (186).

Recent studies by Allen (2) have shown that various microorganisms, in the water phase which is present below gasoline in storage, may have a pronounced deteriorating effect on the motor fuel. Bacterial activity may result in the formation of peroxides and gum in gasoline, leading to the precipitation of lead tetraethyl. Slime for-

mation in paraffin oil was traced to bacterial activity by Scott (150). Samples of paraffin oil as well as castor oil, olive oil, and linseed oil were found by Milne (113) to be contaminated with microorganisms which presumably were growing in the oils.

Cutting and cooling oils used in machine shops are attacked by bacteria, which sometimes create foul odors, cause objectionable alteration of the oils, or contribute to dermatitis of workmen (36,37,107). Liberthson (108) incriminated bacteria in cutting oils as being responsible for the breaking of emulsions, the failure of preservative and inhibiting compounds, and the corrosion of metallic surfaces.

Fleming (49), Gainey (53), and Greig-Smith (62) showed that, due to its susceptibility to microbial attack, paraffin wax cannot be depended upon to protect objects buried in the soil. Lavers and Illman (106) observed that paraffin wax employed to coat packaging materials supported an abundant growth of molds. The deterioration of paraffin wax by microorganisms has been reported by Jensen (92,94), Tausson (183), Tausz (195), Umbreit (205), and by many others (226).

Asphalt, employed for paving streets, air strips, etc., or for waterproofing basements, may be attacked by bacteria in moist soil (169, 226). In the presence of moisture the asphalt coating on concrete blocks was destroyed by soil fungi, according to Hundeshagen (81).

X. Microbial Decomposition of Rubber Hydrocarbons

Pure India rubber, also called caoutchouc, consists of polymerized olefinic hydrocarbons represented by the empirical formula $(C_5H_8)_n$. Caoutchouc is produced by a wide variety of plants, the best yields being obtained from the families Apocynaceae, Euphorbiaceae, and Moraceae. The commercial product is obtained mostly from the plantation rubber tree, *Hevea brasiliensis*. Lesser quantities of latex are obtained from *Hevea benthamiana*, *Castilla ulei*, *C. elastica*, *Manihot glaziovii*, *Ficus elastica*, *Funtumia elastica*, and other wild rubber trees. High percentages of caoutchouc also occur in the Haitian shrub, *Cryptostegia gandiflora*, the guayule plant, *Parthenium argentatum*, certain milkweeds of the genus *Asclepias*, dandelions of the genus *Taraxicum*, and scores of other plants.

Synthetic rubbers or elastomers, including buna types, thiokols, neoprene, chemigum, butyl rubbers, and hundreds of others, are essentially polymers or copolymers of butadiene, isoprene, isobutylene,

styrene, acrylonitrile, and related unsaturated hydrocarbons. Manufactured rubber articles are prepared by compounding natural or synthetic rubber with vulcanizing agents, accelerators, softeners, fillers, pigments, and other organic or inorganic agents to give certain desirable properties of elasticity, resiliency, wearing qualities, heat resistance, vulcanizability, tensile strength, conductivity, inertness toward solvents, color, etc. Antimicrobial agents are sometimes added because natural, synthetic, and compounded rubbers are susceptible to microbial decomposition under certain conditions (232,233).

The microbial utilization of caoutchouc was first reported by Söhnngen (159) in 1913. Söhnngen and Fol (160) isolated from soil and ditch water several cultures, including *Actinomyces alba*, *A. chromogenes*, *A. elastica*, *A. fuscus*, *Bacillus m. sentericus*, *Mycobacterium lacticola*, *M. rubrum*, and *Pseudomonas fluorescens*, which could obtain their carbon and energy requirements from pure rubber in mineral medium.

The red spots which often appear on unpreserved sheets of raw or crepe rubber stored in moist places were shown by Arens (4) to be due to the growth of *Serratia marcescens* with other organisms. From damaged crepe rubber Bloomendaal (16), DeWilderman (33), and Eaton (38) isolated several varieties of chromogenic bacteria, which were held to be responsible for the "spot disease" or perforation of rubber.

The loss of weight and decreased elasticity of moist sheets of plantation rubber during prolonged storage were attributed by DeVries (31,32) to the activities of *Aspergillus* and *Penicillium* species. Among the many species isolated by Corbet (28) from fermenting hevea latex were *Alcaligenes denieri*, *Bacillus pandora*, *Gaffkya verneti*, *Micrococcus chersonesia*, *M. eatoni*, *M. epimetheus*, *M. ridleyi*, and *Torulae heveae*. Novogradski (127) found in soil and on the leaves of rubber plants species of bacteria, actinomyces, and molds which decomposed rubber and decreased its viscosity.

Kalinenko (100) noted during one month's incubation at 28°C. the destruction of from 20 to 40% of the rubber in latex by *Actinomyces aurantiacus*, *A. longisporus ruber*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium* species, and several cultures of mixed microflora commonly found in soil.

Decreases in the yield of rubber from guayule latex of as much as 15 to 20% in six weeks at 37°C. and deterioration in the quality of the remaining rubber were shown by Spence and associates (162,163) to be caused by soil microorganisms. Four species of *Actinomyces* and

several species of anaerobic bacteria, which attacked rubber hydrocarbons, were isolated from guayule latex (161). Allen *et al.* (3) have investigated the decomposition of guayule resins by microorganisms.

ZoBell and Beckwith (232) observed the oxidation of pure caoutchouc as well as several types of compounded rubber, both natural and synthetic, by *Bacterium aliphaticum*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. neritica*, *Serratia marcescens*, *Vibrio marinofulvus*, certain strains of *Escherichia coli*, and several cultures of mixed microflora from the sea or soil. Recognizing that rubber products exposed to water for prolonged periods are ^{open} subject to microbial attack, Dimond and Horsfall (35) recommended that such products be compounded with antimicrobial agents to prevent the microbial oxidation of rubber.

XI. Assimilation of Hydrocarbons by Animals

Although there have been many reports (134,176) that petroleum hydrocarbons pass unabsorbed and unchanged through the intestine of man and other mammals, it is now known that hydrocarbons may be assimilated under certain conditions. It is still indeterminate, however, the extent to which intestinal bacteria contribute to the digestion of hydrocarbons but there is pretty good evidence that some animals have hydrocarbonoclastic enzymes. The author believes that careful investigations will reveal that such enzymes occur in most classes of animals.

A. PARAFFINIC HYDROCARBONS

When Channon (22) included squalene, an unsaturated hydrocarbon, $C_{30}H_{50}$, in the diet of rats there was evidence of some absorption. The cholesterol content of the livers of such rats increased about 100% and there was also a marked increase in the content of unsaponifiable matter. The absorption of mineral oils by rats and pigs was proved by Channon and Collinson (23), who demonstrated an increase in the hydrocarbon content and a decrease in the iodine number of the livers of animals fed on a diet containing liquid paraffin. The recovery from the excreta and tissues of cats of much less *n*-hexadecane than the amount fed led Channon and Devine (24) to conclude that part of the hydrocarbon was converted into other unidentified products in the body. Similar conclusions were reached by El Mahdi and Channon (44) after noting that the absorption of from 50 to 100

mg. of *n*-hexadecane per day from the alimentary tract of the rat was accompanied by an increase in tissue lipides.

Stryker (176) microscopically and chemically examined the mesenteric lymph nodes, liver, spleen, and other tissues of post-mortem human subjects, guinea pigs, rats, and rabbits to establish the absorption of small amounts of mineral oil from the intestinal tract. The absorption of paraffin oil by rats was demonstrated by Frazer *et al.* (51) by histological, biochemical, and chylomicrographic methods.

Employing material tagged with heavy hydrogen, Stetten (168) established that rats absorbed 7,8,9,10-tetradeuterio-*n*-hexadecane and oxidized it partly to fatty acids. The catabolic rate of the hydrocarbon was followed by the content of deuterium in fatty acids and body water. Hexadecane was believed by Stetten to be absorbed from the intestine without the intervention of bacteria and converted first into palmitic acid by oxidative attack on the terminal methyl group, apparently in the liver.

Larvae of the petroleum fly, *Psilopa petrolii*, occur in large numbers living in pools of crude oil waste near wells at Sante Fe Springs, California. Doubting that they could digest oil, Thorpe (202) suggested that the fly larvae obtained their food from the ingestion of bits of organic matter, bacteria, or protozoa. *Amoeba proteus* was reported by Dawson and Belkin (30) to be unable to digest mineral oil, although various vegetable and animal oils were assimilated. Evidence that there are many bacteria which can grow at the expense of hydrocarbons in crude oil has been summarized in preceding sections of this paper (p. 470).

B. AROMATIC HYDROCARBONS

As a detoxication mechanism, animals are able to oxidize a large variety of aromatic hydrocarbons when administered in sublethal doses (70,211). Rabbits were shown by Neubauer (121) to be able to oxidize ethylbenzene to benzoic acid and an alcohol, $C_6H_5CHOHCH_3$. Most of the toluene orally administered to dogs was detected in their urine as hippuric acid by Knoop and Gehrke (104).

Jaffé (90) isolated muconic acid from the urine of dogs following their feeding with benzene. Rabbits were also found to be able to oxidize benzene to muconic acid and phenol. The observation was repeated with dogs and rabbits by Neumaerker (122) and Thierfelder and Klenk (201). Benzene was found by Gadaskin (52) to be oxi-

dized primarily to phenol, which could be detected in the blood within 40 minutes after administration and a little later in the urine.

Bernhard and Gressly (11) isolated muconic acid containing deuterium from the urine of rabbits to which isotopic benzene, C_6D_6 , had been administered. Handler and Perlzweig (70) reported the oxidation of *p*-cymene to cumic acid by sheep, the oxidation of 3,4-benzopyrene to 8-hydroxy-3,4-benzopyrene and 3,4-benzopyrene-5,8-quinone by mice, and the oxidation of 1,2,5,6-dibenzanthracene to a dihydroxy compound by rats, mice, and rabbits. Several other examples of the oxidation of aromatic hydrocarbons by higher animals are given by Von Oettingen (211). He (213) has reported the oxidation of benzene to polyphenols, toluene to benzoic acid, *p*- and *m*-xylene to the corresponding toluic acids, and propylbenzene to benzoic acid.

An increase in the excretion of glucuronates and ethereal sulfates by dogs following the administration of benzene, anthracene, or phenanthrene indicated to Stekol (166) that these hydrocarbons were metabolized.

XII. Production of Hydrocarbons by Microorganisms

Careful examination of their tissues reveals that most plants synthesize hydrocarbons (25,26,142)—very appreciable amounts by some plants such as the Jeffrey pine, guayule plant, and rubber tree. Bacteria and allied microorganisms also produce hydrocarbons either as a part of their protoplasm or as end products of catabolism. In the latter category methane is the only hydrocarbon that has been demonstrated to be produced in large quantities.

Since 1875, when Popoff (132) first demonstrated the formation of methane from the fermentation of cellulose, it has been shown that a large variety of organic compounds as well as molecular hydrogen may provide the energy necessary for the formation of methane (7,231). It is now known from the work of Barker (8) and Stephenson and Stickland (167) that methane is formed primarily from the reduction of carbon dioxide or other one-carbon-atom compounds:



Conclusive proof is lacking for the microbial formation of any gaseous hydrocarbon other than methane as a catabolic product, although there are some highly suggestive reports. For example, Neave and

Buswell (120) reported finding from 0.7 to 12.1% of ethane in the gases produced by bacteria during the fermentation of sewage sludge and distillery slop. Rudolfs and Heisig (140) found, beside methane, hydrogen, and carbon monoxide in the gas given off from fermenting sewage, also from 0.6 to 2.8% of "illuminating gas." Traces of ethane, propane, pentane, and butadiene were detected by Rawn *et al.* (135) along with large quantities of methane in the gas from sewage sludge digestion. The formation of gaseous hydrocarbons beside methane from the fermentation of tributyrin in the presence of base exchange substances was reported by Taylor (198).

Accounts in the literature on the formation of benzene and toluene from the bacterial decomposition of phenylalanine, tyrosine, or other amino acids containing the benzene nucleus have not been confirmed by recent work. Intestinal microflora attacking tyrosine were found by Sieke (153) to form phenol. Phenol and/or *p*-cresol but no benzene or toluene was produced by either mixed or pure cultures of soil and marine organisms investigated by Research Project 43 of the American Petroleum Institute (235).

The conversion of cinnamic acid into styrene by *Aspergillus niger* has been reported by Herzog and Ripke (75). Fergus (48a) has summarized the evidence for the synthesis of ethylene by *Penicillium digitatum* and other microorganisms.

Carotenoids and other pigmented hydrocarbons are known to be produced by a good many species of both aerobic and anaerobic bacteria. The production of liquid and solid paraffinic hydrocarbons ranging from $C_{10}H_{22}$ to $C_{25}H_{52}$ by sulfate-reducing bacteria was reported by Jankowski and ZoBell (91). Further work has established that naphthenic hydrocarbons are also produced by sulfate reducers (235). The hydrocarbons are produced as a part of the bacterial cell substance, the total quantity being of the order of only 0.5% or less of the carbon content.

XIII. Summary and Conclusions

Virtually all kinds of hydrocarbons are susceptible to attack by bacteria and allied microorganisms. This generalization is based upon observations on nearly one hundred pure hydrocarbons ranging in complexity from methane to dibenzanthracene and on several hundred mixtures of hydrocarbons. The latter include natural gases, lignins, gasolines, kerosenes, benzines, lubricating oils, fuel oils, paraffin

waxes, tars, crude oils, asphalts, asphaltenes, synthetic and natural rubbers, etc. Benzene, toluene, xylene, naphthalene, and other hydrocarbons sometimes used as preservatives are decomposed by certain microorganisms.

A good many species of bacteria, yeasts, and molds have been shown to produce hydrocarbonoclastic enzymes. Employed as criteria of hydrocarbon attack have been microbial multiplication, oxygen consumption, carbon dioxide production, modification of hydrocarbons, and methylene blue reduction in mineral media containing hydrocarbons as the sole source of carbon and energy. Similarly, sulfate and nitrate reduction have been employed as criteria for the attack of hydrocarbons by certain anaerobic bacteria.

Rapid assimilation requires the employment of special techniques to disperse in aqueous media hydrocarbons having low solubilities. Emulsifying the hydrocarbons in aqueous media or dispersing them adsorbed on the surface of sand, asbestos fibers, diatomaceous earth, or other particulate materials has produced good results.

Hydrocarbonoclastic microorganisms appear to be quite widely and abundantly distributed in soil, natural bodies of water, and in submerged sediments. They are especially abundant in oil-soaked soil around oil fields and refineries. Certain microorganisms develop the ability to attack hydrocarbons after being grown for several generations in nutrient medium enriched with hydrocarbons, which indicates adaptive enzyme formation.

The ability of microorganisms to attack hydrocarbons is highly specific. In general, paraffinic hydrocarbons are attacked more readily and by more species than cyclic compounds. The susceptibility to oxidation appears to increase with chain length up to about fifteen or twenty carbon atoms, above which extremely low solubility makes hydrocarbons less vulnerable to attack. Double bonds in open-chain hydrocarbons and branching or side chains in all kinds of hydrocarbons increase oxidizability.

Carbon dioxide and microbial cell substance are the principal products resulting from the oxidation of hydrocarbons. Organic acids, aldehydes, ketones, alcohols, oxyphenols, pigmented substances, and modified hydrocarbons are also produced.

Hydrocarbons can be expected to be attacked wherever crude oil or its distillation products are in contact with water under conditions favorable for microbial multiplication. When thoroughly dispersed

under aerobic conditions, as in soil soaked with oil, the hydrocarbons may be rapidly and quantitatively oxidized. The gradual disappearance of oil spilled on waterways or on soil around petroleum works is believed to be due largely to microbial activity. Hydrocarbon-oxidizing microorganisms may modify crude oil or prevent its accumulation in certain environments. The activity, presence, or products of bacteria which oxidize volatile hydrocarbons in soil overburdening subterranean deposits may serve as indicators in so-called geomicrobiological prospecting methods. The use of microorganisms in the recovery, refinery, and conversion of hydrocarbons has almost unlimited possibilities in the petroleum industry.

Films of oil spread on bodies of stagnant water or on the leaves of vegetation to control mosquitoes or other insects may be destroyed by microbial activity. The growth of bacteria in cooling and cutting oils in machine shops has been responsible for objectionable conditions. Without proper preservatives, hydrocarbon products buried in soil or water can be expected to have a short life as waterproofing or insulating agents. Pharmaceutical preparations containing hydrocarbons emulsified in water as well as paraffin wax used to coat packaging materials support the growth of microorganisms.

Bacteria in the gut of animals may contribute to the digestion of hydrocarbons, although there is evidence that rats, cats, dogs, and other experimental animals absorb and assimilate both paraffinic and aromatic hydrocarbons in small amounts, independent of the action of microorganisms.

Beside methane, the microbial production of which is well authenticated, smaller amounts of ethane, propane, pentane, butadiene, styrene, carotene, and other hydrocarbons have been reported to be produced by microorganisms. Liquid and solid paraffinic hydrocarbons as well as naphthenic hydrocarbons have been demonstrated in the cell substance of bacteria utilizing fatty acids.

References

1. Aiyer, P. A. S., *Mem. Dept. Agr. India, Chem. Ser.*, **5**, 173 (1920).
2. Allen, F. H., *J. Inst. Petroleum*, p. 9, January 1945.
3. Allen, P. J., Naghski, J., and Hoover, S. R., *J. Bact.*, **47**, 559 (1944).
4. Arens, P., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, **35**, 465 (1912).
5. Bach and Sierp, *ibid.*, **62**, 24 (1924).
6. Baier, C. R., *Kieler Meeresforschungen*, **2**, 149 (1937).
- 6a. Baldacci, E., *Olearia*, **1947**, 90.
7. Baldwin, I. L., *Soil Sci.*, **14**, 465 (1922).

8. Barker, H. A., *Arch. Mikrobiol.*, **7**, 404 (1936); **7**, 420 (1936).
9. Bartels, R., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, **103**, 1 (1940).
10. Beckman, J. W., *Ind. Eng. Chem., News Ed.*, **4**, 3 (1926).
11. Bernhardt, K., and Gressly, E., *Helv. Chim. Acta*, **24**, 83 (1941).
12. Bierast, W., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. I*, **74**, 348 (1914).
13. Birch-Hirschfeld, L., *ibid.*, *Abt. II*, **86**, 113 (1932).
14. Birkhaug, K. E., *Science*, **76**, 236 (1932).
15. Blau, L. W., U. S. Pat. 2,269,889 (1942).
16. Bloomendaal, H. N., *Arch. Rubbercult. Nederland. Indië*, **7**, 361 (1921).
17. Buddin, W., *J. Agr. Sci.*, **6**, 417 (1914).
18. Buell, C., and Weston, W. H., *Am. J. Botany*, **34**, 555 (1947).
19. Bushnell, L. D., and Haas, H. F., *J. Bact.*, **41**, 653 (1941).
20. Büttner, H., *Arch. Hyg.*, **97**, 12 (1926).
21. Carr, R. H., *Soil Sci.*, **8**, 67 (1919).
22. Channon, H. J., *Biochem. J.*, **20**, 400 (1926).
23. Channon, H. J., and Collinson, G. A., *ibid.*, **23**, 676 (1929).
24. Channon, H. J., and Devine, J., *ibid.*, **28**, 467 (1934).
25. Chibnall, A. C., *et al.*, *ibid.*, **28**, 2189 (1934).
26. Chibnall, A. C., and Piper, S. H., *ibid.*, **28**, 2209 (1934).
27. Clarke, H. T., and Mazur, A., *J. Biol. Chem.*, **141**, 283 (1941).
28. Corbet, A. S., *J. Bact.*, **19**, 321 (1930).
29. Czekalowski, J. W., and Skarzynski, B., *J. Gen. Microbiol.*, **2**, 231 (1948).
30. Dawson, J. A., and Belkin, M., *Biol. Bull.*, **56**, 80 (1929).
31. DeVries, O., *Arch. Rubbercult. Nederland. Indië*, **11**, 262 (1927).
32. DeVries, O., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, **74**, 22 (1928).
33. DeWilderman, E., *Caoutchouc & gutta-percha*, **9**, 61 (1912).
34. DeWitt, S., *J. Biol. Chem.*, **147**, 327 (1943).
35. Dimond, A. E., and Horsfall, J. G., *Science*, **97**, 144 (1943).
36. Duckham, A., *Petroleum*, London, **5**, 142 (1943).
37. Duffett, N. D., Gold, S. H., and Weirich, C. L., *J. Bact.*, **45**, 37 (1943).
38. Eaton, B. J., *Agr. Bull. Federated Malay States*, **5**, 177 (1917).
39. Edwards, G. A., Buell, C., and Weston, W. H., *Am. J. Botany*, **34**, 551 (1947).
40. Egloff, G., and Schaad, R. E., *Chem. Revs.*, **6**, 91 (1929).
41. Egorova, A. A., *Microbiology U. S. S. R.*, **11**, 131 (1942).
42. Egorova, A. A., and Kutznetsow, S. I., *Bull. acad. sci. U. R. S. S.*, **95**, 1 (1945).
43. Elazari-Volcani, B., *Nature*, **152**, 274 (1943).
44. El Mahdi, M. A. H., and Channon, H. J., *Biochem. J.*, **27**, 1487 (1933).
45. Erikson, D., *J. Bact.*, **41**, 277 (1941).
46. Ernst, O., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. I*, **150**, 154 (1943).
47. Evans, W. C., *Biochem. J.*, **41**, 373 (1947).
48. Faugeras-Schiff, J., *Rev. pétrolifère*, **164**, 14 (1926).
- 48a. Ferguson, C. L., *Growth and Ethylene Production of Penicillium digitatum*
Sacc. Thesis, Pennsylvania State College, 1948.
49. Fleming, W. E., *J. Agr. Research*, **34**, 335 (1927).
50. Fowler, G. J., Ardern, E., and Lockett, W. T., *Proc. Roy. Soc. London*, **B83**, 149 (1911).
51. Frazer, A. C., Schulman, J. H., and Stewart, H., *J. Physiol.*, **103**, 306 (1944).
52. Gadaskin, I. D., *Biochem. Z.*, **198**, 149 (1928).
53. Gainey, P. L., *J. Agr. Research*, **10**, 355 (1917).
54. Giglioli, I., and Masoni, G., *Staz. sper. agrar. ital.*, **42**, 589 (1909).
55. Giglioli, I., and Masoni, G., *Pisa Università Studi e Ricerche*, **22**, 76 (1914).

56. Ginsburg-Karagitscheva, T. L., *Bull. Am. Assoc. Petroleum Geol.*, **17**, 52 (1933).
57. Ginsburg-Karagitscheva, T. L., *Intern. Geol. Congr. 17th Session Moscow*, p. 27 (1937).
58. Goobin, V. M., *Russian Health Resort Service*, No. 5, 3 (1923).
59. Grant, C. W., and ZoBell, C. E., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **51**, 266 (1942).
60. Gray, P. H. H., *Proc. Roy. Soc. London*, **B102**, 263 (1928).
61. Gray, P. H. H., and Thornton, H. G., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, **73**, 74 (1928).
62. Grieg-Smith, R., *Proc. Linnean Soc. N. S. Wales*, **39**, 538 (1914).
63. Grimm, M., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, **41**, 647 (1914).
64. Haag, F. E., *Arch. Hyg.*, **97**, 28 (1926).
65. Haag, F. E., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, **71**, 1 (1927).
66. Haas, H. F., *The Bacterial Utilization of Petroleum Products and the Production of Carotenoid Pigments*. Thesis, Kansas State College, 1942.
67. Haas, H. F., Bushnell, L. D., and Peterson, W. J., *Science*, **95**, 631 (1942).
68. Haas, H. F., Yantzi, M. F., and Bushnell, L. D., *Trans. Kansas Acad. Sci.*, **44**, 39 (1941).
69. Hall, H. C., *Ber. klin. Wochschr.*, **52**, 1326 (1915).
70. Handler, P., and Perlzweig, W. A., *Ann. Rev. Biochem.*, **14**, 717 (1945).
71. Harper, H. J., *Soil Sci.*, **48**, 461 (1939).
72. Harrison, W. H., and Aiyer, P. A. S., *Mem. Dept. Agr. India, Chem. Ser.*, **4**, 1 (1916).
73. Hasemann, W., *Biochem. Z.*, **184**, 147 (1927).
74. Headlee, T. J., and Miller, M., *Ann. Rept. N. J. Agr. Exptl. Stat.*, **47**, 237 (1927).
75. Herzog, R. O., and Ripke, O., *Z. physiol. Chem.*, **57**, 43 (1909).
76. Hessel, F. A., *Mat. grasses*, **16**, 6936 (1924).
77. Heukelekian, H., *Bull. N. J. Agr. Exptl. Stat.*, **486**, 51 (1929).
78. Heyn, A., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. I*, **79**, 185 (1917).
79. Hopkins, S. J., and Chibnall, A. C., *Biochem. J.*, **26**, 133 (1932).
80. Hoppe-Seyler, F., *Ber.*, **16**, 122 (1883).
81. Hundeshagen, R., *Bautenschutz*, **6**, 141 (1935).
82. Hutton, W. E., *Studies on Bacteria Which Oxidize Methane*. Thesis, University of California, Los Angeles, 1948.
83. Imelik, B., *Compt. rend.*, **226**, 922 (1948).
84. Imelik, B., *ibid.*, **226**, 1227 (1948).
85. Imelik, B., *ibid.*, **226**, 2082 (1948).
86. Isjurova, A., *Microbiology U. S. S. R.*, **10**, 242 (1941).
87. Isjurova, A., *Biochemical Oxidation of Oil and the Influence of These Processes on the Properties of Water*. Thesis, Moscow, 1943.
88. Issatchenko, B. L., Reinfel'd, E. A., and Sturm, L. D., *Bull. acad. sci. U. R. S. S.*, No. 9, 95 (1945).
89. Jacobs, S. E., *Ann. Applied Biol.*, **18**, 98 (1931).
90. Jaffé, M., *Z. physiol. Chem.*, **62**, 58 (1909).
91. Jankowski, G. J., and ZoBell, C. E., *J. Bact.*, **47**, 447 (1944).
92. Jensen, H. L., *Proc. Linnean Soc. N. S. Wales*, **56**, 345 (1931).
93. Jensen, H. L., *ibid.*, **57**, 364 (1932).
94. Jensen, H. L., *ibid.*, **59**, 19 (1934).
95. Jentsch, A. B., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, **53**, 130 (1921).
96. Jezl, J., *Bacterial Oxidation of Biphenyl*. Thesis, Pennsylvania State College, 1942.

97. Johnson, F. H., Goodale, W. T., and Turkevich, J., *J. Cellular Comp. Physiol.*, **19**, 163 (1942).
98. Johnson, F. H., and Schwarz, H. W., *J. Bact.*, **47**, 373 (1944).
99. Kalabina, M., and Rogovskaya, C., *Z. Fischerei*, **32**, 153 (1934).
100. Kalinenko, V. O., *Microbiology U. S. S. R.*, **7**, 119 (1938).
101. Kaserer, H., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, **15**, 573 (1906).
102. Kegel, *Chem.-Ztg.*, **64**, 507 (1940).
103. Kluyver, A. J., and Schnellen, C. G. T. P., *Arch. Biochem.*, **14**, 57 (1947).
104. Knoop, R., and Gehrke, M., *Z. physiol. Chem.*, **146**, 63 (1925).
105. Lantzsck, K., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, **57**, 309 (1922).
106. Lavers, C. G., and Illman, W. I., *Can. J. Research*, **24**, 117F (1946).
107. Lee, M., and Chandler, A. C., *J. Bact.*, **41**, 373 (1941).
108. Liberthson, *Lubrication Eng.*, **1**, 103 (1945).
109. Lipman, C. B., and Greenberg, L., *Nature*, **129**, 204 (1932).
110. Maliyantz, A. A., *Azerbaidzhanskoe Neftyanoe Khoz.*, **6**, 89 (1935).
111. Marsland, D. A., *J. Cellular Comp. Physiol.*, **4**, 9 (1933).
112. Matthews, A., *J. Agr. Sci.*, **14**, 1 (1924).
113. Milne, G. R., *Pharm. J.*, **140**, 81 (1938).
114. Miyoshi, M., *Jahrb. wiss. Botan.*, **28**, 269 (1895).
115. Mogilevskii, G. A., *Razvedka Nedr.*, **12**, 32 (1940).
116. Moore, F. W., *J. Gen. Microbiol.*, **3**, 143 (1949).
117. Morton, H. E., and Pulaski, E. J., *J. Bact.*, **35**, 163 (1938).
118. Münz, E., *Zur Physiologie der Methanbakterien*. Thesis, Friedrichs University, Halle (1915).
119. Münz, E., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, **51**, 380 (1920).
120. Neave, S. L., and Buswell, A. M., *Ind. Eng. Chem.*, **20**, 837 (1928).
121. Neubauer, O., *Arch. exptl. Path. Pharmacol.*, **46**, 133 (1901).
122. Neumaerker, H., *Z. physiol. Chem.*, **126**, 203 (1923).
123. Nicol, H., *Petroleum, London*, **5**, 205 (1942).
124. Norris, D., *J. Aust. Inst. Agr. Sci.*, **10**, 77 (1944).
125. Novelli, G. D., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **52**, 133 (1943).
126. Novelli, G. D., and ZoBell, C. E., *J. Bact.*, **47**, 447 (1944).
127. Novogradski, D., *Microbiology U. S. S. R.*, **1**, 413 (1932).
128. Osnitskaya, L. K., *ibid.*, **15**, 249 (1946).
129. Parish, H. J., *J. Path. Bact.*, **35**, 143 (1932).
130. Perrier, A., *Ann. sci. agron.*, **130**, 321 (1913).
131. Pickering, S. U., *J. Agr. Sci.*, **3**, 32 (1909).
132. Popoff, L., *Arch. ges. Physiol. Pflügers*, **10**, 113 (1875).
133. Rahn, O., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, **16**, 382 (1906).
134. Randolph, N. A., *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.*, p. 281 (1885).
135. Rawn, A. M., Banta, A. P., and Pomeroy, R., *Trans. Am. Soc. Civil Engrs.*, **104**, 93 (1939).
136. Renault, B., *Compt. rend.*, **124**, 1315 (1897).
137. Rogers, G. S., *U. S. Geol. Survey Profess. Papers*, **117**, 1 (1919).
138. Rogers, T. H., *Nature*, **152**, 105 (1943).
139. Rosenfeld, W. D., *J. Bact.*, **54**, 664 (1947).
140. Rudolfs, W., and Heisig, H. M., *Sewage Works J.*, **1**, 519 (1929).
141. Russell, E. J., and Hutchinson, H. B., *J. Agr. Sci.*, **3**, 111 (1909).
142. Sanders, J. M., *J. Inst. Petroleum Technol.*, **23**, 525 (1937).
143. Sanderson, R. T., U. S. Pat. 2,294,425 (1942).
144. Schneegans, D., *Congr. intern. mines mét. et géol. appl. 7th Session Paris, Geol. Sect.*, **1**, 351 (1935).

145. Schollenberger, C. J., *Soil Sci.*, **29**, 261 (1930).
146. Schuman, R. L., Farrell, M. A., and Stone, R. W., *J. Bact.*, **45**, 14 (1943).
147. Schuscha, A. T., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. I*, **79**, 161 (1917).
148. Schwartz, W., and Müller, A., *Erdöl u. Kohle*, **1**, 232 (1948).
149. Schwartz, W., and Müller, A., *Arch. Mikrobiol.*, **14**, 291 (1949).
150. Scott, J., *Petroleum World, Los Angeles*, **18**, 160 (1921); **18**, 370 (1921).
151. Sen Gupta, N. N., *J. Agr. Sci.*, **11**, 136 (1931).
152. Sherf, A. F., *Phytopathology*, **33**, 330 (1943).
153. Sieke, F., *Z. Hyg. Infektionskrankh.*, **94**, 214 (1921).
154. Sisler, F. D., and ZoBell, C. E., *Science*, **106**, 521 (1947).
155. Skarzynski, B., and Czekalowski, J. W., *Nature*, **158**, 304 (1946).
- 155a. Slavnina, G. P., *Compt. rend. acad. sci. U. R. S. S.*, **56**, 205 (1947).
- 155b. Slavnina, G. P., *Microbiology U. S. S. R.*, **17**, 76 (1948).
156. Söhngen, N. L., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, **15**, 513 (1906).
157. Söhngen, N. L., *Rec. trav. chim.*, **29**, 238 (1910).
158. Söhngen, N. L., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, **37**, 595 (1913).
159. Söhngen, N. L., *ibid.*, **38**, 621 (1913).
160. Söhngen, N. L., and Fol, J. G., *ibid.*, **40**, 87 (1914).
161. Spence, D., *J. Research Assoc. Brit. Rubber Mfrs.*, **4**, 87 (1935).
162. Spence, D., and McCullom, W. J., *Trans. Inst. Rubber Ind.*, **11**, 119 (1935).
163. Spence, D., and Van Niel, C. B., *Ind. Eng. Chem.*, **28**, 847 (1936).
164. Stahl, A. F. W. v., *Petroleum Z.*, **7**, 8 (1931).
165. Stanier, R. Y., *J. Bact.*, **55**, 477 (1948).
166. Stekol, J. A., *J. Biol. Chem.*, **110**, 463 (1935).
167. Stephenson, M., and Stickland, L. H., *Biochem. J.*, **27**, 1517 (1933).
168. Stetten, D., *J. Biol. Chem.*, **147**, 327 (1943).
169. Stone, R. W., Fenske, M. R., and White, A. G. C., *J. Bact.*, **44**, 169 (1942).
170. Stone, R. W., White, A. G. C., and Fenske, M. R., *ibid.*, **39**, 91 (1940).
171. Störmer, K., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, **20**, 282 (1908).
172. Strawinski, R. J., *The Dissimilation of Pure Hydrocarbons by Members of the Genus Pseudomonas*. Thesis, Pennsylvania State College, 1943.
173. Strawinski, R. J., and Stone, R. W., *J. Bact.*, **40**, 461 (1940).
174. Strawinski, R. J., and Stone, R. W., *ibid.*, **45**, 16 (1943).
175. Sturm, L. D., and Orlova, S. I., *Microbiology U. S. S. R.*, **6**, 754 (1937).
176. Stryker, W. A., *Arch. Path.*, **31**, 670 (1941).
177. Taggart, M. S., U. S. Pat. 2,234,637 (1941).
178. Taggart, M. S., U. S. Pat. 2,349,472 (1944).
179. Taggart, M. S., U. S. Pat. 2,396,900 (1946).
180. Taggart, M. S., U. S. Pat. 2,442,476 (1948).
181. Tattersfield, F., *Ann. Applied Biol.*, **15**, 57 (1927).
182. Tausson, T. A., *Microbiology U. S. S. R.*, **8**, 828 (1939).
183. Tausson, W. O., *Biochem. Z.*, **155**, 356 (1925).
184. Tausson, W. O., *J. botan. U. R. S. S.*, **9**, 161 (1925).
185. Tausson, W. O., *Planta*, **4**, 214 (1927).
186. Tausson, W. O., *Neftyanoe Khoz.*, **14**, 220 (1928).
187. Tausson, W. O., *Biochem. Z.*, **193**, 85 (1928).
188. Tausson, W. O., *Planta*, **5**, 239 (1928).
189. Tausson, W. O., *ibid.*, **7**, 735 (1929).
190. Tausson, W. O., *Arkh. Biol. Nauk*, **43**, 267 (1936).
191. Tausson, W. O., and Aleshina, W. A., *Microbiology U. S. S. R.*, **1**, 229 (1932).
192. Tausson, W. O., and Shapiro, S. O., *ibid.*, **3**, 79 (1934).
193. Tausson, W. O., and Tausson, T. A., *ibid.*, **2**, 221 (1933).

194. Tausson, W. O., and Vesselov, I. J., *ibid.*, **3**, 360 (1934).
195. Tausz, J., *Petroleum Z.*, **15**, 553 (1919).
196. Tausz, J., and Donath, P., *Z. physiol. Chem.*, **190**, 141 (1930).
197. Tausz, J., and Peter, M., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, **49**, 497 (1919).
198. Taylor, E. M., *Nature*, **121**, 789 (1928).
199. Thaysen, A. C., *J. Inst. Petroleum Technol.*, **25**, 111 (1939).
200. Thaysen, A. C., *Proc. Third Intern. Congr. Microbiol.*, p. 729 (1940).
201. Thierfelder, H., and Klenk, E., *Z. physiol. Chem.*, **141**, 29 (1924).
202. Thorpe, W. H., *Trans. Entomol. Soc. London*, **78**, 331 (1930); *Nature*, **130**, 437 (1932).
203. Tomkins, R. G., *Dept. Sci. Ind. Research Brit. Food Invest.*, p. 68 (1930).
204. Truffault, G., and Bezssonoff, N., *Compt. rend.*, **171**, 1089 (1920).
205. Umbreit, W. W., *J. Bact.*, **38**, 73 (1939).
206. Urbain, V., *Compt. rend.*, **132**, 334 (1901).
207. Van de Velde, A. J. J., *Mededeel. Koninkl. Vlaam. Acad. Wetenschap. Belg., Klasse Wetenschap.*, **3**, 3 (1941).
208. Vesselov, I. J., *Microbiology U. S. S. R.*, **6**, 510 (1937).
209. Vierling, K., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II*, **52**, 193 (1920).
210. Vigier, P., *Arch. sci. phys. nat.*, **23**, 138 (1941).
211. von Oettingen, W. F., *U. S. Pub. Health Service Pub. Health Bull.*, **255**, 1 (1940).
212. von Oettingen, W. F., *Physiol. Rev.*, **22**, 170 (1942).
213. von Oettingen, W. F., *Yale J. Biol. Med.*, **15**, 167 (1942).
214. Wackenhut, A. M., *Arch. sci. biol. U. S. S. R.*, **43**, 55 (1936).
215. Wagner, R., *Z. Gärungsphysiol.*, **4**, 289 (1914).
216. Walbum, L. E., *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. I*, **69**, 6 (1920).
217. Wernham, C. C., *Mycologia*, **38**, 691 (1946).
218. Wiken, T., *Iva*, **13**, 178 (1942); *Chem. Zentr.*, **1943**, 1091.
219. Young, P. A., *Phytopathology*, **24**, 266 (1934).
220. Yurovskii, A. Z., Kaplash, G. P., and Mangubi, B. V., *Ugol*, **7**, 48 (1939).
221. ZoBell, C. E., *Petroleum World Los Angeles*, **40**, 30 (1943).
222. ZoBell, C. E., *J. Bact.*, **49**, 522 (1945).
223. ZoBell, C. E., *Science*, **102**, 364 (1945).
224. ZoBell, C. E., *Oil Weekly*, **120** (12), 30 (1946).
225. ZoBell, C. E., *Marine Microbiology. Chronica Botanica*, Waltham, p. 146, 1946.
226. ZoBell, C. E., *Bact. Revs.*, **10**, 1 (1946).
227. ZoBell, C. E., *Am. Petroleum Inst. Research Vol.*, **1**, 103 (1943); **2**, 63 (1946); **3**, 100 (1949).
228. ZoBell, C. E., U. S. Pat. 2,413,278 (1946).
229. ZoBell, C. E., *Oil Gas J.*, **46** (13), 62 (1947).
230. ZoBell, C. E., *World Oil*, **126** (13), 36; **127** (1), 35 (1947).
231. ZoBell, C. E., *Bull. Am. Assoc. Petroleum Geol.*, **31**, 1709 (1947).
232. ZoBell, C. E., and Beckwith, J. B., *J. Am. Water Works Assoc.*, **36**, 439 (1944).
233. ZoBell, C. E., and Grant, C. W., *Science*, **96**, 379 (1942).
234. ZoBell, C. E., Grant, C. W., and Haas, H. F., *Bull. Am. Assoc. Petroleum Geol.*, **27**, 1175 (1943).
235. ZoBell, C. E., and Associates, *Am. Petroleum Inst. Quarterly Progress Reports* (1942-49).
236. Zuidema, H. H., *Chem. Revs.*, **38**, 197 (1946).

AUTHOR INDEX*

A

- Aaberg, B., 34 (ref. 161), 44
 Abelin, I., 94 (ref. 5), 118
 Abrahams, M. D., 327 (ref. 217), 340 (ref. 217), 366 (ref. 217), 385 (ref. 217), 395 (ref. 217), 440
 Abramson, H. A., 282, 311
 Abul-Fadl, M. A. M., 91 (ref. 3), 92 (refs. 2, 2a, 2b, 2c), 93 (ref. 2c), 97 (ref. 103), 100 (ref. 2c), 101 (ref. 2a), 104 (refs. 1, 103), 109, 111 (ref. 2c), 115, 118, 121
 Adams, M. A., 10 (ref. 237), 46
 Adams, M. E., 308, 313
 Adler, E., 174 (ref. 27), 204 (ref. 141), 208, 213 (ref. 141), 218, 220
 Aebi, H., 94 (refs. 4, 5), 118
 Agner, K., 61, 81
 Ahlström, L., 307, 311
 Aiyer, P. A. S., 446 (ref. 72), 449 (ref. 1), 449 (ref. 72), 454, 465, 481, 483
 Akabori, S., 242, 311
 Akobe, K., 275, 311
 Alberi, J. T., 149 (ref. 12), 150 (ref. 12), 165
 Albers, D., 91 (ref. 6c), 93 (ref. 6e), 99 (ref. 6d), 101 (ref. 6d), 108 (refs. 6a, b), 118
 Albers, E., 91, 92 (ref. 8), 93, 94 (ref. 8), 119
 Albers, H., 84, 85 (ref. 7b), 91, 92 (ref. 8), 93, 94 (ref. 8), 108, 109, 111 (refs. 7a, 9), 115, 116, 118 (refs. 7b, 9), 119
 Aleshina, W. A., 447 (ref. 191), 448, 449, 459, 470, 473, 485
 Allen, 230
 Allen, F. H., 473, 481
 Allen, J. G., 10, 37, 39, 41
 Allen, P. J., 476, 481
 Allen, M. T., 93 (ref. 68), 120
 Allison, F. E., 249, 311
 Ambler, J. A., 193 (ref. 121), 220, 408 (ref. 1), 434
 Amlong, H. U., 247, 311
 Anagnostopoulos, C., 97 (ref. 10), 119
 Andersag, 243
 Andreadis, T., 338 (ref. 2), 367 (ref. 2), 368, 370, 434
 Andrews, J. C., 307, 311
 Anfinsen, C. B., 191, 192, 220
 Anslow, W. P., 241, 280, 313
 Anson, M. L., 298, 311
 Apitz, K., 29, 39
 Archibald, R. M., 311
 Ardern, E., 463 (ref. 50), 482
 Arens, P., 475, 481
 Ark, P. A., 278, 311
 Armstrong, A. R., 100 (ref. 11), 119
 Armstrong, E. F., 132 (ref. 1), 142
 Armstrong, K. F., 132 (ref. 1), 142
 Armstrong, S. H., 22 (ref. 80), 29 (ref. 80), 30 (ref. 61), 41
 Arnon, D. J., 247, 311
 Arnov, L. E., 5 (ref. 165), 24, 44
 Arthus, M., 1, 7, 40
 Asakawa, K., 86 (refs. 12a, b), 90 (ref. 12a), 119
 Ashworth, J., 22 (ref. 62), 29 (ref. 62), 41
 Askew, H. O., 327 (refs. 3, 5), 353 (ref. 5), 399 (refs. 3-5), 402 (refs. 3-5), 434
 Astrup, P., 34 (ref. 4), 40
 Astrup, T., 1 (ref. 9), 4, 5 (refs. 9, 13), 6 (ref. 13), 8, 10 (ref. 6), 19, 21-23, 26, 29, 30 (ref. 9), 31, 32 (ref. 12), 33 (ref. 7), 34 (ref. 113), 35, 38, 39, 40, 42, 46
 Atkins, W. R. G., 173 (ref. 23), 218
 Attoe, O. J., 356, 437
 Attwood, M. P., 7 (ref. 191), 19 (ref. 191), 45
 Audus, L. J., 311
 Auerbach, V. H., 188 (ref. 90), 219
 Augier, J., 311
 Avery, A., 29, 40
 Avineri-Shapiro, S., 141 (ref. 27), 142

* *Italic numbers refer to the bibliographies of the different papers.*

B

- Baccari, V., 99 (ref. 13), 119
 Bach, 481
 Bach, E., 265, 311
 Bacon, C. W., 338 (ref. 70), 402 (ref. 69), 436
 Baeyer, 51
 Bai, Nguyen-Kim, 104 (ref. 113), 121
 Baier, C. R., 453, 473, 481
 Bailey, J. H., 267, 314, 321
 Bailey, K., 104 (ref. 14), 119
 Baird, G. R., 432 (ref. 121), 437
 Baker, D., 374, 434
 Baker, J. W., 55-57, 62, 68, 74, 77, 81
 Baker, Z., 176 (ref. 41), 218
 Bakwin, H., 96 (ref. 15), 119
 Balabukha-Poptzova, V., 367 (ref. 7), 402 (ref. 7), 434
 Baldacci, E., 450, 481
 Baldwin, I. L., 472, 478 (ref. 7), 481
 Balks, R., 225, 312
 Balls, A. K., 302, 311
 Bamann, E., 83 (ref. 20), 84, 85 (refs. 17, 18), 89 (ref. 17), 90 (refs. 17, 22, 24), 92 (ref. 16), 99 (refs. 18, 19, 23), 112, 113 (ref. 21a), 117, 119
 Bancroft, F. W., 10, 35 (ref. 56), 41, 46
 Banga, I., 189 (ref. 97), 219
 Banta, A. P., 479 (ref. 135), 484
 Barber, H. H., 308, 312
 Barger, G., 261, 263, 273, 312
 Barker, H. A., 127, 129 (refs. 11, 21-23), 130 (ref. 11), 131 (ref. 20), 132 (ref. 21), 134 (ref. 22), 135 (ref. 11), 136 (ref. 23), 138 (refs. 10, 20-22), 139 (refs. 10, 46), 140 (ref. 9), 141 (ref. 10), 142, 143, 478, 482
 Barker, N. W., 38 (ref. 147), 43
 Barnard, R. D., 37 (ref. 193), 45
 Barnes, R. H., 5 (refs. 166, 167), 44
 Barratt, J. O. W., 4, 40
 Barrenscheen, H. K., 272, 312
 Barron, E. S. G., 91 (ref. 25), 98 (ref. 25), 119, 216, 221, 300, 312
 Barsøe, O. C., 35 (ref. 27), 40
 Barta, L., 338 (refs. 9, 17), 353 (refs. 17, 19), 370 (ref. 18), 372 (refs. 9, 18), 377 (refs. 17, 18), 388 (refs. 8, 17, 19), 402 (ref. 17), 414, 415, 434
 Bartels, R., 463 (ref. 9), 482
 Bartlett, G. R., 216, 221, 312
 Bartz, Q. R., 149 (ref. 12), 150 (ref. 12), 163 (ref. 39), 165, 166
 Bastley, 246
 Batham, H. N., 431, 434
 Bauer, E., 85 (ref. 123), 87 (refs. 123, 124), 91 (ref. 26), 95 (ref. 123), 113 (ref. 26), 119, 122
 Baumann, J., 30 (ref. 28), 40
 Baumberger, J. P., 33 (ref. 29), 40
 Baumgärtel, T., 307, 309, 310, 312
 Bayer, H., 200 (ref. 134), 201 (ref. 134), 202 (ref. 134), 220
 Bays, R. P., 27 (ref. 149), 43
 Beach, 284
 Beadle, G. W., 71, 82
 Becker, H. W., 430 (ref. 239), 440
 Beckman, J. W., 444 (ref. 10), 472, 482
 Beckwith, J. B., 444 (ref. 232), 447 (ref. 232), 451 (ref. 232), 475 (ref. 232), 476, 486
 Beevers, H., 383, 385 (ref. 11), 387, 429 (ref. 92), 434, 437
 Begtrup, H., 19 (ref. 294), 47
 Behm, W. v., 20 (ref. 74), 41
 Behrens, J., 335 (ref. 12), 336 (ref. 12), 363, 366, 371 (ref. 12), 378, 388 (refs. 12, 13), 410-412, 434
 Beinhart, E. G., 373 (ref. 146), 416, 417, 438
 Belfanti, S., 84 (ref. 28a), 85 (ref. 28), 90 (ref. 28a), 97 (ref. 28), 103 (ref. 28c), 104 (ref. 28a), 105 (ref. 28), 119
 Belitzer, V. A., 189 (ref. 95), 219
 Beljaev, A. I., 369 (ref. 14), 370 (ref. 14), 371 (ref. 14), 434
 Belkin, M., 452, 477, 482
 Bell, H. J., 29 (ref. 154), 32 (ref. 154), 34 (ref. 30), 40, 44
 Bellamy, W. D., 70, 81
 Bendich, A., 5 (ref. 59), 33 (ref. 59), 41
 Benischke, H., 283
 Bennett, 275
 Bennett, G. M., 56, 81
 Benoy, M. P., 176 (refs. 41, 42), 218
 Beraldo, W. T., 39 (ref. 267), 47
 Bergeim, O., 53, 81
 Bergel, F., 319
 Bergmann, M., 104 (ref. 130), 122, 302
 Bergstermann, H., 312
 Berman, M., 221 (ref. 161), 222
 Bernard, C., 51
 Bernhard, K., 466 (ref. 11), 478, 482
 Bernhauer, K., 170 (ref. 4), 217, 238, 312
 Bernheim, F., 216, 221
 Bersin, T., 95 (ref. 67), 120, 227, 235, 240, 253, 260, 262, 268, 276, 278, 288-290, 294, 300, 302, 304, 309, 312, 315
 Berthet, J., 89 (ref. 37a), 119
 Bertrand, I., 5, 19 (ref. 33), 35 (refs. 32, 257), 37 (ref. 257), 40, 46

- Best, C. H., 34 (ref. 4), 40
 Beyer, E., 108, 109 (ref. 9), 111 (ref. 9),
 115 (ref. 9), 116 (ref. 9), 118 (ref. 9),
 119
 Bezssonoff, N., 450, 486
 Bicknell, F., 248, 250, 312
 Bide, A. E., 255, 321
 Bierast, W., 452, 482
 Biggs, R., 20 (ref. 34), 40
 Billimoria, M. C., 407 (refs. 159, 160),
 438
 Binder-Kortba, G., 338 (ref. 15), 402
 (ref. 15), 434
 Binet, L., 291, 312
 Binkley, F., 241, 280, 307, 313
 Binkley, S. B., 149 (ref. 12), 150 (ref.
 12), 165
 Birch-Hirschfeld, L., 450, 456 (ref.
 13), 467 (ref. 13), 482
 Bird, R. M., 10 (ref. 35), 40
 Birkhaug, K. E., 453, 482
 Birkinshaw, J. H., 240, 313
 Bishop, M. N., 154 (ref. 29), 165
 Bjerkelund, C., 25 (ref. 36), 40
 Blanchard, M. H., 283, 318
 Blau, L. W., 449 (ref. 15), 455, 482
 Blaurock, G., 226, 313
 Bleibtret, M., 37, 40
 Blick, R. T. J., 327 (ref. 5), 353 (refs.
 5, 16), 399 (refs. 4, 5), 402 (refs.
 4, 5, 16), 434
 Bloch, K., 177, 218
 Block, M. H., 37 (ref. 1), 39
 Block, R. J., 279, 284, 313
 Bloomendaal, H. N., 475, 482
 Boas, F., 231, 247, 313
 Bodansky, O., 87 (ref. 29), 96 (refs.
 15, 29a, b, c), 97 (ref. 29c), 100 (ref.
 29f), 101 (refs. 29, 29a, c), 103 (ref.
 29c), 104 (refs. 29b, c), 105 (ref.
 29f), 119
 Bodnár, J., 338 (refs. 17, 20), 353 (refs.
 17, 19), 370 (ref. 18), 372 (ref. 18),
 377 (refs. 17, 18), 388 (refs. 17, 19),
 402 (refs. 17, 20), 414, 415, 434
 Boekhout, F. W. J., 369, 413, 434
 Bohnenkamp, A., 108, 109 (ref. 9), 111
 (ref. 9), 115 (ref. 9), 116 (ref. 9),
 118 (ref. 9), 119
 Bollman, J. L., 27, 37, 46
 Bolomey, P., 291, 313
 Bonner, D., 58, 71, 82
 Bonner, J., 246, 313, 374, 375 (ref.
 134), 434, 438, 441
 Bonner, M., 313
 Bordet, J., 2, 7, 9, 27, 29, 30 (ref. 41),
 40
 Bordet, P., 12 (ref. 114), 27 (ref. 114),
 30 (ref. 114), 35 (ref. 114), 42
 Borek, E., 263, 272, 273, 322
 Borg, W. A. J., 317
 Borsook, H., 273, 276, 313
 Bortnik, L. A., 235, 319
 Boswell, J. G., 375, 385 (ref. 23), 435
 Bouchilloux, S., 86 (ref. 104), 88 (ref.
 104), 91 (ref. 30), 92 (ref. 105), 93
 (ref. 105), 99 (ref. 104), 100 (ref.
 104), 106 (ref. 104), 110 (ref. 30,
 104), 111 (ref. 30), 116 (refs. 30, 105),
 119, 121
 Bowling, J. D., 327 (refs. 24, 139), 338
 (ref. 70), 402 (refs. 24, 69), 435, 436,
 438
 Bradford, J. A., 433 (refs. 25, 26), 435
 Brahinsky, R., 5 (ref. 167), 44
 Brambel, C. E., 26, 40
 Brand, E., 279, 284, 286, 301, 313, 317
 Brand, R. W., 376 (ref. 157), 438
 Brauns, F., 141 (ref. 14), 142
 Breusch, F. L., 182, 183 (ref. 66), 191,
 193 (ref. 110), 215 (ref. 68), 219, 220
 Brice, B. A., 373 (ref. 166), 389 (ref.
 209), 438, 440
 Brink, N. G., 147 (ref. 7), 149 (refs.
 9, 10), 151 (refs. 9, 10), 153 (refs.
 16, 17), 154 (refs. 16-18, 155 (refs.
 16, 17, 22), 157 (refs. 18, 27), 165
 Brinkhous, K. M., 2, 10, 16, 17, 26
 (ref. 308), 33 (ref. 47), 41, 47, 48
 Broadbrooks, K. J., 370 (ref. 108), 437
 Broschard, R. W., 164 (ref. 43), 166
 Brown, D. E., 327 (refs. 24, 139), 338
 (ref. 70), 402 (ref. 24), 435, 436, 438
 Brown, G. B., 241, 313
 Brown, W. L., 315
 Bruce, W. F., 192 (ref. 116), 220, 257,
 317
 Bruce-Mitford, M., 34 (ref. 156), 44
 Brückner, H., 338 (ref. 27), 339 (ref.
 27), 357 (ref. 27), 370 (ref. 27),
 372 (ref. 27), 373 (ref. 27), 402 (ref.
 27), 415, 435
 Bruson, H. A., 263, 313
 Buchanan, J. M., 177, 183, 184, 185
 (ref. 74), 187, 191, 192, 213, 219,
 220
 Bucherer, H., 431, 435
 Buchner, E., 412, 435
 Buck, J. S., 313
 Buckland, I. K., 141 (ref. 14), 142
 Buckwalter, J. A., 17 (ref. 126a), 43
 Buddin, W., 451, 463, 482
 Buell, C., 453, 482
 Bugie, E., 146, 165
 Burk, D., 249, 311

- Burkard, J., 126 (ref. 2), 142, 434 (ref. 148), 438
 Burkholder, P. R., 245, 313
 Burl, D., 316
 Burris, R. H., 329 (ref. 33), 365 (ref. 33), 435
 Burrows, R. R., 308, 312
 Bushnell, L. D., 445 (ref. 19), 447, 449, 458 (refs. 19, 68), 465 (ref. 19), 466, 467 (ref. 68), 469, 470 (refs. 67, 68), 473 (ref. 19), 482
 Bussy, 310, 313
 Buswell, A. M., 479, 484
 Butler, E. T., 313
 Butlin, K. R., 308, 313
 Büttner, H., 444 (ref. 20), 445 (ref. 20), 447, 449, 465, 473 (ref. 20), 482
- C
- Cahill, G. F., 279, 313
 Califano, L., 279, 313
 Cameron, J. W., 22 (ref. 228), 46
 Campbell, H. A., 18 (ref. 48), 41
 Campbell, J. M., 441
 Capus, R., 336 (ref. 31), 435
 Caputto, R., 91 (ref. 31a), 92 (ref. 31b), 93 (ref. 31b), 119
 Carl, A., 99 (ref. 19), 119
 Carpenter, G., 10, 41
 Carr, R. H., 472, 473 (ref. 21), 482
 Carroll, R. T., 12 (ref. 296), 48
 Carter, H. E., 147 (ref. 5), 149 (ref. 12), 150 (ref. 12), 165
 Catch, J. R., 273, 313
 Cavallito, C. J., 254, 258, 267, 313, 314, 321
 Cayrol, P., 276, 315
 Cedrangolo, F., 91 (ref. 32a), 93 (ref. 32a), 119
 Ceithaml, J., 203 (ref. 138), 204 (ref. 140), 210, 220
 Chaffee, E., 236, 318
 Chain, E., 250, 253
 Chaix, P., 274, 279, 314
 Chak, I. M., 23, 41
 Challenger, F., 240, 241, 258, 263, 265, 266, 275, 314
 Chandler, A. C., 444 (ref. 107), 462, 474 (ref. 107), 484
 Chandler, J. P., 241, 322
 Channon, H. J., 460 (ref. 23), 476, 482
 Chanutin, A., 14, 41
 Chargaff, E., 1, 4-7, 9, 20, 33, 34, 35 (refs. 52, 56), 41
 Charles, A. F., 34 (ref. 158), 44
 Charlton, P. T., 240, 241, 258, 263, 265, 266, 275, 314
 Chase, 273
 Chatanger, F., 236, 308, 315
 Chesney, 260
 Chibnall, A. C., 285, 314, 444 (refs. 25, 26), 449, 459, 467, 478 (refs. 25, 26), 482, 483
 Chinard, F. P., 316
 Chodat, R., 385 (ref. 32), 435
 Christian, W., 98, 104 (ref. 144), 122, 276
 Cioglia, L., 234, 314
 Clagett, C. O., 329 (ref. 33), 365 (ref. 33), 435
 Claisen, L., 170, 217
 Claren, O. B., 178, 218
 Clark, A. B., 170, 217
 Clark, R. K., 147 (ref. 5), 149 (ref. 12), 150 (ref. 12), 165
 Clarke, H. T., 270, 318, 482
 Clawson, 260
 Cloetens, R., 85 (refs. 33a, b), 87 (ref. 33), 93 (ref. 33), 96, 99 (refs. 33d, e), 100 (ref. 33), 104 (refs. 33a, b), 105 (refs. 33a-e), 113 (refs. 33a, c-e), 114, 115, 119
 Coe, M. R., 376 (ref. 245), 441
 Cohen, N. H., 413, 435
 Cohn, E. J., 22 (ref. 62), 29, 30, 41, 283, 318
 Cohn, M., 241, 280, 322
 Cole, S. W., 51, 82
 Collett, M. E., 216, 221
 Collingwood, B. J., 22, 41
 Collinson, G. A., 460 (ref. 23), 476, 482
 Colowick, S. P., 189 (ref. 94), 219
 Conley, C. L., 27, 41
 Conrad, J. P., 304, 314
 Consden, R., 59, 80, 81
 Constantinescu, P. G., 336 (ref. 141), 338 (ref. 141), 438
 Contardi, A., 84 (ref. 28a), 85 (ref. 28), 90 (ref. 28a), 97 (ref. 28), 103 (ref. 28c), 104 (ref. 28a), 105 (ref. 28), 119
 Contronlis, J., 163 (refs. 39, 40), 166
 Cook, A. H., 273, 313
 Copley, A. L., 35 (ref. 65), 41
 Copley, M. J., 347 (ref. 37), 373 (refs. 37, 166), 435, 438
 Corbet, A. S., 475, 482
 Cori, C. F., 127 (ref. 3), 142, 189 (ref. 94), 219
 Correll, J. T., 23 (ref. 66), 41
 Couch, J. F., 330 (ref. 35), 347, 348, 373 (refs. 35-37, 125, 146, 166), 374, 416, 417, 435, 437, 438
 Coulson, 284
 Courtois, J., 84, 85 (refs. 35, 106), 87

- (ref. 34), 88, 94 (ref. 95a), 106 (ref. 35), 107 (ref. 35), 119, 120, 121
- Covo, G. A., 189 (ref. 100), 219
- Cowles, P. B., 236, 314
- Coyne, F. P., 263, 273, 312
- Crandall, D. I., 188 (ref. 88), 219
- Crawford, M., 179 (ref. 56), 218
- Crocker, W., 237, 320
- Crooks, H. M., 149 (ref. 12), 150 (ref. 12), 163 (refs. 39, 40), 165, 166
- Cross, R. J., 189 (ref. 100), 219
- Csonka, 284
- Cullen, C. E., 30 (ref. 67), 41
- Czapek, F., 299, 314
- Czekalowski, J. W., 463, 482, 485
- D**
- Dagley, S., 81
- Dale, H. H., 9, 41
- Dam, H., 3, 20, 27, 30, 41
- Danzas, E., 85 (ref. 114), 87 (ref. 114), 98 (ref. 107), 106 (refs. 114, 137a), 107, 121, 122
- Darkis, F. R., 327 (ref. 41), 332 (ref. 45), 334 (ref. 45), 353 (refs. 38-41, 45), 354 (ref. 45), 355 (ref. 45), 399 (refs. 38-40, 45), 400 (ref. 45), 401, 402 (refs. 38-41, 45), 403-408, 422, 423, 425, 435
- Darling, S., 4, 5 (ref. 13), 6 (ref. 13), 21, 22, 29, 31, 32 (ref. 12), 35, 38, 40
- Dávalos, J. U., 410, 435
- Davenport, H. W., 313
- Davy, L. G., 370 (ref. 108), 437
- Dawes, E. A., 58-60, 62, 64, 65, 68-70, 73, 81
- Dawson, E. R., 100 (ref. 36), 119
- Dawson, J., 58-60, 64, 69, 79, 81
- Dawson, J. A., 452, 477, 482
- Dawson, R. F., 407 (ref. 43), 435
- Deasy, C. L., 242, 316
- De Duve, C., 89 (ref. 37a), 119
- Deffner, M., 170, 173 (ref. 21), 217, 218
- Deines, v., 232, 314
- Deitz, V. R., 316
- DeKock, P. C., 383, 387, 429 (ref. 92), 437
- Delange, L., 9, 27 (ref. 40), 40
- Delory, G. E., 94 (refs. 37, 66b), 95 (ref. 66a), 113 (ref. 66), 119, 120
- del Regno, F., 101 (ref. 96), 121
- Demeter, K. J., 422, 435
- Denigés, 282
- Denis, 1
- Dent, C. E., 270, 284, 314
- De Rey-Pailhade, 289, 291
- Derrien, M., 311, 314
- Derrien, Y., 91 (ref. 30), 110 (ref. 30), 111 (ref. 30), 116 (ref. 30), 119
- Desnuelle, P., 284, 307, 314
- De Sütö-Nagy, G. J., 35 (ref. 215), 45
- Désveaux, R., 276, 295, 317
- Detre, L., 29, 41
- Deutsch, H. F., 19, 41
- Devine, J., 476, 482
- Devinian, P. S., 313
- de Vries, H., 369, 413, 434
- De Vries, O., 475, 482
- DeWalt, C. W., 154 (ref. 21), 155, 165
- Dewar, E. T., 235, 314
- De Wilderman, E., 475, 482
- De Witt, S., 482
- De Young, M., 5 (refs. 166, 167), 44
- Dickman, S. R., 147 (ref. 5), 149 (ref. 12), 150 (ref. 12), 165
- Diederichs, K., 85 (ref. 17), 89 (ref. 17), 90 (ref. 17), 99 (ref. 23), 119
- Dikanowa, A., 126 (ref. 36), 143
- Dillon, R. T., 85 (ref. 70), 86 (ref. 70), 120
- Dimofte, N., 402 (refs. 225-227), 440
- Dimond, A. E., 476, 482
- Dirscherl, W., 182 (ref. 62), 219
- Dittmer, K., 249, 314
- Dixon, F. J., 37 (ref. 193), 45
- Dixon, H. H., 173 (ref. 23), 218
- Dixon, L. F., 332 (ref. 45), 334 (ref. 45), 353 (refs. 38-40, 45), 354 (ref. 45), 355 (ref. 45), 399 (refs. 38-40, 45), 400, 401, 402 (refs. 38-40, 45), 403-408, 422, 423, 425, 435
- Dodge, B. O., 313
- Doerr, R., 297, 314
- Dolliver, M. A., 147 (ref. 8), 165
- Donath, P., 243, 445 (ref. 196), 447, 455, 458, 460, 461 (ref. 196), 469, 473 (ref. 196), 486
- Donker, H. J. L., 233, 317
- Dore, W. H., 129 (refs. 21, 22), 132 (ref. 21), 134 (ref. 22), 138 (refs. 21, 22), 142
- Dornbush, A. C., 164 (ref. 43), 166
- Dörr, W., 373 (ref. 117), 374 (ref. 117), 434, 437
- Dorst, S. E., 6 (ref. 203), 45
- Doub, L., 23, 47
- Doudoroff, M., 123 (refs. 6, 13), 124 (ref. 12), 125-127, 128 (ref. 8), 129 (refs. 11, 21-23, 43), 130 (ref. 11), 131 (ref. 20), 132 (ref. 21), 134 (ref. 22), 135 (ref. 11), 136 (ref. 23), 138 (refs. 6, 10, 20-22), 139 (refs. 10, 46), 140 (ref. 9), 141 (refs. 10, 12), 142, 143
- Drake, B. B., 295, 314

Dubnoff, J. W., 273, 313
 Duckham, A., 444 (ref. 36), 474 (ref. 36), 482
 Dufait, R., 97 (ref. 75), 99 (ref. 75), 105 (ref. 75), 113 (ref. 75), 120
 Duffett, N. D., 444 (ref. 37), 474 (ref. 37), 482
 Dufrenoy, J., 254, 319
 Duggar, B. M., 164, 166
 Dunn, C. G., 409 (ref. 168), 439
 Dupret, L., 89 (ref. 37a), 119
 Durand, J., 96 (ref. 115), 99 (ref. 115), 121
 Dutcher, J. D., 257, 317
 Dyckerhoff, H., 15 (ref. 120), 20 (ref. 74), 41, 43, 315

E

Eagle, H., 2, 10 (ref. 76), 41
 Eakin, E. A., 249, 314
 Eakin, R. E., 249, 314, 316
 Eastes, J. W., 263, 313
 Eaton, B. J., 475, 482
 Eaton, S. V., 224, 314
 Edlbacher, S., 95, 116, 119
 Edsall, G., 19 (ref. 77), 41
 Edsall, J. T., 22, 29, 30, 32 (ref. 79), 33, 41, 42
 Edwards, G. A., 453, 482
 Eggleston, L. V., 56, 82, 192 (ref. 113), 193, 220, 244, 317
 Egloff, G., 455 (ref. 40), 456, 482
 Egorova, A. A., 463 (refs. 41, 42), 482
 Ehrhardt, G., 273, 314
 Eisner, A., 389 (ref. 209), 392 (refs. 80, 246), 433 (ref. 166a), 436, 438, 440, 441
 Ek, B., 103 (ref. 39), 108 (ref. 39a), 109, 115 (ref. 39b), 119
 Elazari-Volcani, B., 451, 482
 Eldridge, J. A., 257, 314
 Elliot, L., 174 (ref. 27), 218
 Elliott, K. A. C., 176, 177, 218
 Ellis, D., 240, 314
 Ellis, E. L., 276, 313
 Ellison, J., 79, 80, 81
 El Mahdi, M. A. H., 476, 482
 Elvehjem, C. A., 96 (ref. 60), 101 (ref. 60), 104 (ref. 60), 120
 Embden, G., 186 (ref. 77), 188, 219
 Emde, H., 237, 318
 Emerson, 257
 Emmanuel, H. F., 370 (refs. 158, 185), 438, 439
 Emmett, P. H., 355 (ref. 46), 435
 Enders, C., 173 (ref. 25), 218, 431, 432, 435

Engelhardt, V. A., 98 (ref. 40), 119
 Engelmann, 233
 Engle, H. B., 327 (ref. 139), 438
 Enowicz, M., 33 (ref. 93), 38, 42
 Eny, D. M., 365, 439
 Erocli, A., 84 (ref. 28a), 85 (ref. 28), 90 (ref. 28a), 97 (ref. 28), 103 (ref. 28c), 104 (ref. 28a), 105 (ref. 28), 119
 Erdtmann, E., 85 (ref. 41), 98, 99 (ref. 41), 103, 113 (ref. 41), 119
 Erickson, B. N., 12, 42
 Erikson, D., 444 (ref. 45), 450, 453 (ref. 45), 457, 463, 482
 Ernst, O., 482
 Euler, H. v., 103 (refs. 39, 42, 43), 108 (refs. 39a, 42), 109, 115, 119, 120, 174 (ref. 27), 204, 208, 213 (ref. 141), 218, 220, 230, 304, 307, 311, 314
 Evans, E. A., 69 (ref. 54), 82, 169, 172, 196 (ref. 16), 218
 Evans, H. J., 372, 435
 Evans, M. G., 64
 Evans, W. C., 69, 74-76, 78 (ref. 19), 81, 463 (ref. 47), 482
 Everard, B. A., 27 (ref. 84), 42
 Eysenbach, H., 176 (ref. 37), 218, 256, 316

F

Fahey, J. L., 20 (ref. 301), 25 (ref. 214), 26 (ref. 214), 27 (ref. 83), 42, 45, 48
 Faitelowitz, A., 388 (ref. 50), 431, 435
 Fangeras-Schiff, J., 482
 Fantl, P., 20, 21 (ref. 83), 23-26, 27 (ref. 84), 42
 Färber, 238
 Farrell, M. A., 485
 Feinstein, R. M., 88 (ref. 44), 120
 Feissly, R., 5, 10, 27 (ref. 91), 33 (ref. 93), 38, 42
 Feldsted, E. T., 15, 44
 Fenske, M. R., 446 (refs. 169, 170), 456 (ref. 170), 459 (ref. 169), 465 (refs. 169, 170), 466 (ref. 170), 474 (ref. 169), 485
 Fergus, C. L., 479, 482
 Ferguson, J. H., 2, 12-14, 21 (refs. 124, 125), 22, 27 (ref. 100), 33 (refs. 99, 119), 37, 42, 43
 Ferry, J. D., 30, 31, 32 (ref. 102), 42
 Ferry, R. M., 22 (ref. 80), 29 (ref. 80), 41, 91 (ref. 90), 121
 Fesca, M., 410, 435
 Feulgen, R., 260, 315
 Fidler, E., 15, 35 (ref. 65), 41, 44
 Fiedler, H., 294, 315

- Fildes, P., 59, 71, 75, 76, 81
 Findlay, W. P. K., 240, 313
 Finkelstein, M., 6, 27 (ref. 104), 42
 Finnegan, J. K., 429, 433 (refs. 52-54),
 435, 436, 437, 438
 Fischer, A., 4-7, 34, 35, 42, 54, 74, 81
 Fischer, F. G., 175 (ref. 32), 176, 218,
 281, 315
 Fishel, J. B., 433 (ref. 56), 435
 Fittig, R., 192 (ref. 117), 220
 Fleischhacker, H. H., 97 (ref. 45), 120
 Fleming, A., 250, 315
 Fleming, W. E., 449, 474, 482
 Fleury, P., 88, 120
 Florey, H. W., 250
 Floyd, N. F., 176 (ref. 45), 177, 182,
 184 (ref. 69), 187, 188 (refs. 45, 87),
 218, 219
 Flynn, E. H., 147 (ref. 7), 149 (ref. 9),
 151 (ref. 9), 152 (ref. 15), 153 (refs.
 16, 17), 154 (refs. 16-18, 20), 155
 (refs. 16, 17, 22), 157 (refs. 15, 18,
 27, 28), 158 (ref. 28), 165
 Fodor, A., 343 (ref. 57), 388 (ref. 57),
 414, 435
 Foëx, H., 336 (ref. 31), 435
 Fol, J. G., 444 (ref. 160), 470, 475, 485
 Folin, 284
 Folkers, K., 68, 82, 147 (refs. 6, 7), 149
 (refs. 9-11), 150 (ref. 13), 151 (refs.
 9, 10), 152 (ref. 15), 153 (refs. 16, 17),
 154 (refs. 16-18, 20), 155 (refs. 16, 17,
 22, 24, 25), 157 (refs. 15, 18, 27, 28),
 158 (ref. 28), 160 (ref. 31), 162 (ref.
 38), 164 (ref. 46), 165, 166, 236, 248,
 315, 316
 Folley, S. J., 83 (ref. 47), 84, 85, 87
 (ref. 47), 120
 Fonó, A., 103 (ref. 42), 108 (ref. 42),
 115, 119
 Fordham, D., 433 (ref. 53), 435
 Foster, G. L., 319
 Foster, J. F., 30 (ref. 81), 42
 Foster, M. L., 53, 82
 Fowler, F. L., 141 (ref. 14), 142
 Fowler, G. J., 463, 482
 Franke, W., 174 (ref. 29), 218
 Frankenburg, W. G., 326 (ref. 59), 340
 (ref. 59), 345 (ref. 60), 350 (ref. 58),
 353 (ref. 58), 357 (refs. 58, 60), 362
 (ref. 60), 366, 370 (ref. 59), 371 (ref.
 58), 372 (ref. 59), 374 (ref. 58), 375
 (ref. 60), 377 (refs. 58-62), 380 (ref.
 60), 381 (ref. 58), 382 (ref. 58), 388
 (ref. 58, 63), 389 (refs. 59, 60a-62),
 390 (ref. 62), 391 (ref. 60a), 393 (ref.
 61), 395 (refs. 58, 59), 412 (ref. 63),
 426 (ref. 58), 436, 436
 Frazer, A. C., 477, 482
 Fredericq, P., 8 (ref. 130), 12, 13, 27,
 30 (ref. 114), 35 (ref. 114), 42, 43
 Fresenius, 258
 Frey-Wyssling, A., 425, 436
 Frieber, W., 52, 55, 74, 81
 Fried, J., 147 (ref. 4), 154 (ref. 19),
 160 (ref. 32), 161 (ref. 35), 162 (refs.
 36, 37), 165, 166
 Friedmann, E., 186 (ref. 78), 219, 277,
 319
 Friedrich-Freksa, H., 194 (ref. 125),
 195 (ref. 125), 196 (ref. 125), 197 (ref.
 125), 220
 Fries, H., 335 (ref. 64), 436
 Fromageot, C., 84 (ref. 48), 120, 236,
 274, 279, 307, 308, 310, 314, 315
 From-Hansen, P., 19 (ref. 294), 47
 Fuchs, H. J., 8 (ref. 115), 43
 Fuld, E., 2, 4, 43
 Fullerton, H. W., 19 (ref. 117), 43
 Fulton, L. D., 12, 43
 Funk, 243

G

- Gable, I. U. O., 366 (ref. 65), 436
 Gadaskin, I. D., 477, 482
 Gage, T. B., 373 (ref. 87a), 436
 Gainey, P. L., 449, 474, 482
 Gale, E. F., 253, 254, 315
 Gale, P., 162 (ref. 38), 164 (ref. 46),
 166
 Galsmar, I., 35 (refs. 20, 21), 40
 Gardell, S., 34 (ref. 161), 44
 Garner, W. W., 332 (ref. 68), 338 (ref.
 70), 356 (ref. 66), 358 (ref. 68), 370
 (ref. 68), 377 (ref. 67), 388 (ref. 67),
 399 (ref. 68), 402 (refs. 68, 69), 436
 Gärtner, K., 338 (refs. 15, 71), 402 (ref.
 15), 434, 436
 Gehrke, M., 477, 484
 Geiger, F., 32 (ref. 163), 33 (ref. 163),
 44
 Gell, P. G. H., 231, 317
 Genevois, I., 276, 315
 Gengon, O., 7, 27, 29, 30 (ref. 41), 40
 Gerarde, H. W., 19, 41
 Gerheim, E. B., 12 (ref. 101), 33 (ref.
 119), 42, 43
 Gernow, J., 307, 311
 Ghosh, J. C., 282, 315
 Giggelberger, 261
 Giglioli, I., 449 (refs. 54, 55), 454, 465,
 482
 Gilman, 230
 Gilwood, M. E., 407, 437

- Ginsburg-Karagitscheva, T. L., 451, 473, 483
 Giovannozzi, M., 418, 421, 436
 Giri, K. V., 23, 41, 95 (ref. 49), 120
 Glamser, H., 6 (ref. 75), 41
 Glavind, J., 1 (ref. 122), 43
 Glawe, R., 432, 435
 Glazko, A. J., 21 (refs. 123-125), 31, 33 (ref. 99), 37, 42, 43
 Glenn, F., 10 (ref. 35), 40
 Goddard, D. R., 315
 Gold, S. H., 444 (ref. 37), 474 (ref. 37), 482
 Goldberg, 284
 Goldsmith, D., 278, 315
 Goldwater, W. H., 286, 313
 Gollub, M. C., 203 (ref. 138), 220
 Gomori, G., 87 (ref. 50b), 89, 120
 Goobin, V. M., 450, 455, 473 (ref. 58), 483
 Goodale, W. T., 447 (ref. 97), 457 (ref. 97), 458 (ref. 97), 461 (ref. 97), 465 (ref. 97), 471 (ref. 97), 473 (ref. 97), 484
 Goossens, N., 20 (ref. 74), 41
 Gordon, A. H., 59, 80, 81
 Gordon, S., 164 (ref. 43), 166
 Gorowitsch, E. A., 176, 218
 Gottschalk, A., 132, 142
 Gottscho, A., 377 (refs. 61, 62), 389 (refs. 61, 62), 390 (ref. 62), 393 (ref. 61), 436
 Gould, B. S., 93 (ref. 51), 97 (ref. 51), 104 (ref. 51), 120
 Graber, R. P., 149 (ref. 11), 150 (ref. 13), 165
 Grafflin, A. L., 188 (ref. 89), 203, 206, 212, 219, 220
 Graham, A. R., 273, 313
 Graham, J. B., 17 (ref. 126a), 43
 Gralén, N., 278, 315
 Gram, H. C., 30 (ref. 127), 43
 Grand, R., 315
 Grandeau, L., 349 (ref. 189), 367 (ref. 189), 411 (ref. 189), 439
 Granick, S., 305, 315
 Grant, C. W., 446 (ref. 234), 447 (ref. 234), 451 (refs. 59, 234), 453 (ref. 234), 457 (ref. 234), 458 (ref. 234), 473 (ref. 234), 475 (ref. 233), 483, 486
 Grassmann, W., 293, 315
 Gratia, A., 7, 8 (ref. 130), 27, 43
 Grattan, J. F., 95 (refs. 133, 134), 100 (ref. 133), 122
 Gray, P. H. H., 446 (ref. 60), 452, 453 (ref. 61), 457, 462 (ref. 61), 463, 483
 Green, D. F., 116, 120, 188 (ref. 89), 189 (ref. 100), 219, 245, 315
 Green, H., 106 (ref. 78), 107, 120, 128 (ref. 40), 143
 Greenberg, D. M., 14, 31, 43
 Greenberg, L., 451, 462 (ref. 109), 484
 Greenberg, L. D., 315
 Greene, J., 313
 Greenstein, J. P., 85 (ref. 53), 120, 282, 302, 315
 Greig, M. E., 176 (ref. 42), 177, 218
 Greig-Smith, R., 448, 449, 474, 483
 Gressly, E., 466 (ref. 11), 478, 482
 Gribbins, M. F., 402 (ref. 73), 426 (ref. 74), 436
 Griffith, R. B., 372, 436
 Grimm, M., 483
 Grisolia, S., 210 (ref. 142), 220
 Grob, K., 423-425, 436
 Grönwall, A., 34 (ref. 132), 35 (ref. 132), 43
 Gross, P. M., 22 (ref. 228), 46, 327 (ref. 41), 332 (ref. 45), 334 (ref. 45), 353 (refs. 38-41, 45), 354 (ref. 45), 355 (ref. 45), 399 (refs. 38-40, 45), 400 (ref. 45), 401, 402 (refs. 38-41, 45), 403-408, 422, 423, 425, 435
 Gross, W. O., 225, 315
 Grouvelle, M., 410, 438
 Grünewald, O., 20 (ref. 74), 41
 Grüning, W., 31 (ref. 309), 38 (ref. 322), 48
 Guerrant, 246
 Guest, G. M., 4 (ref. 202), 45
 Guest, M. M., 22 (ref. 302), 24, 25 (ref. 304), 26 (ref. 304), 29, 32 (ref. 303), 48
 Guidi, G., 20 (ref. 133), 43
 Guirard, B. M., 221 (ref. 164), 222
 Gulland, J. M., 87 (ref. 54), 120
 Gunsalus, I. C., 59, 61, 62, 64, 65, 70, 81, 82
 Günther, G., 174 (ref. 27), 204 (ref. 141), 208, 213 (ref. 141), 218, 220
 Gurin, S., 177, 183, 184 (ref. 51), 185 (ref. 74), 187, 188 (ref. 88), 218, 219, 269, 315
 Guthrie, J. D., 293, 316
 György, P., 316
- ## H
- Haag, F. E., 447 (ref. 64), 449, 450 (ref. 65), 459, 469 (ref. 65), 483
 Haag, H. B., 429, 433 (refs. 52-54, 76, 78), 435, 436, 437, 438
 Haagen-Smit, A. J., 242, 316
 Haas, H. F., 445, 446 (ref. 234), 447

- 449, 450, 451 (ref. 234), 453 (ref. 234),
457 (ref. 234), 458, 465 (ref. 19),
466, 467, 468 (ref. 68), 469, 470, 473,
482, 483, 486
- Haas, P., 241, 275, 316
- Hackney, E. J., 327 (ref. 41), 353 (ref.
41), 402 (ref. 41), *435*
- Hafez, M. M., 56, *81, 82*
- Hahn, L., 103 (ref. 39), 108 (ref. 39a),
109, 115 (ref. 39b), *119*
- Haines, P. G., 392 (refs. 80, 246), *436,*
441
- Haley, D. E., 351, 356 (ref. 81), 402
(ref. 73), 418, 419, 421, 426 (ref.
74), 433 (refs. 81, 95), *436, 437, 438,*
439
- Hall, C. E., 30, *43*
- Hall, H. C., 452, *483*
- Hall, J. A., 332 (ref. 45), 334 (ref. 45),
354 (ref. 45), 355 (ref. 45), 399 (ref.
45), 400 (ref. 45), 401, 402 (ref. 45),
403-408, 422, 423, 425, *485*
- Hallauer, C., 297, *314*
- Halliday, D., 307, *321*
- Hallmann, N., 168, 178, 180 (ref. 53),
199, 214, 215 (ref. 53), *218*
- Hamilton, P. B., *311*
- Hamm, R., *320*
- Hammarsten, O., 1, 3, 29, *43*
- Hammett, F. S., 269, 274, 378, *316*
- Handler, P., 477 (ref. 70), 478, *483*
- Handley, W. R. C., 69, 74-76, 78 (ref.
19), *81*
- Hanes, C. S., 127 (ref. 16), *142*
- Hankinson, R., 407 (ref. 83), *436*
- Hanmer, H. R., 433 (refs. 25, 26), *435*
- Hann, R. M., 133 (ref. 30), 136 (ref. 17),
142
- Happold, F. C., 52-60, 62, 64-66, 68,
69, 71, 74-77, 78 (ref. 19), 79, 80,
81, 82, 385 (ref. 83), 436
- Harington, C. R., 287, 293, *316*
- Harlan, W. R., 433 (refs. 25, 26), *435*
- Harlow, E. S., 433 (ref. 26), *435*
- Harper, G. J., 253, *316*
- Harper, H. J., 465, *483*
- Harpley, C. H., 61 (ref. 37), *82*
- Harris, S. A., 68, *82, 248, 316*
- Harrison, W. H., 446 (ref. 72), 449
(ref. 72), 454, 465 (ref. 72), *483*
- Hart, E. B., 96 (ref. 60), 101 (ref. 60),
104 (ref. 60), *120*
- Hart, E. R., 23 (ref. 212), 27 (ref. 212),
46
- Hartley, L. J., 17 (ref. 126a), *43*
- Hartt, C. E., 129 (ref. 18), *142*
- Harvey, H. W., 225, *316*
- Hasegawa, H., 373 (refs. 84, 85), 374
(refs. 84, 85), *436*
- Hasek, R. H., 370 (ref. 108), *437*
- Hasemann, W., 449 (ref. 73), 454, 473,
483
- Haskins, J. F., 433 (ref. 56), *435*
- Haskins, W. T., 136 (ref. 17), *142*
- Hassid, W. Z., 123 (ref. 6), 124 (ref.
12), 126, 127, 129 (refs. 11, 21-23, 38,
39, 43), 130 (ref. 11), 131 (ref. 20),
132 (refs. 19, 21), 134 (ref. 22), 135
(ref. 11), 136 (ref. 23), 138 (refs.
6, 10, 20-22), 139 (refs. 10, 46),
140 (ref. 9), 141 (refs. 10, 12), *142,*
143
- Haworth, W. N., 138 (ref. 24), *142*
- Headlee, T. J., 444 (ref. 74), 451, 472,
483
- Heffter, A., 289, *316*
- Hehre, E. J., 141, *142*
- Heidelberger, C., 198, *220*
- Heilbron, J., 273, *313*
- Heisig, H. M., 479, *484*
- Hellerman, L., 86 (ref. 98), 116, *121,*
304, 316
- Henningway, A., 169, 172, 196 (ref. 15),
218
- Henry, 254
- Herbert, D., 74, *82, 116, 120, 245,*
315
- Herbert, F. K., 19, 38, *43*
- Hermstädt, S. F., 335 (ref. 86), *436*
- Hers, H. G., 89 (ref. 37a), *119*
- Hertel, E., 36 (ref. 299), *48*
- Herter, C. A., 53, *82*
- Herzfeld, E., 52, 68, *82*
- Herzog, R. O., 479, *483*
- Hesse, G., 256, *316*
- Hessel, F. A., 414 (ref. 76), 445, *483*
- Hestrin, S., 124 (ref. 26), 140 (ref. 26),
141 (ref. 27), *142*
- Heukelekian, H., 447 (ref. 77), *483*
- Heumüller, E., 85 (ref. 18), 99 (refs.
18, 19), *119*
- Heuser, L. J., 147 (ref. 8), *165*
- Heymann, W., 87 (ref. 55), 94 (ref. 55),
120
- Heyn, A., 446 (ref. 78), 452, *483*
- Hibbert, H., 141 (ref. 14), *142*
- Higashi, A., 5 (refs. 166, 167), 44
- Hijman, A. J., 243, *322*
- Hill, E. M., 273, *316*
- Hill, G. R., 238, *321*
- Hind, H. G., 32, *45*
- Hirmke, K., 336-338, 358 (ref. 87),
436
- Hirose, R. S., 23 (ref. 139), *43*
- Hobson, F. C. G., 20 (ref. 318), *48*

- Hoffert, D., 176 (ref. 35), 218
 Hoffhine, C. E., 149 (ref. 11), 150 (ref. 13), 155 (refs. 24, 25), 162 (ref. 38), 164 (ref. 46), 165, 166
 Hoffman, G. R., 26 (ref. 308), 48
 Hoffmann-Walbeck, 250
 Hoffman-Ostenhof, O., 85 (ref. 56), 95 (ref. 56), 120
 Hofmann, K., 316, 322
 Hogeboom, G. H., 215 (ref. 148), 220
 Holdsworth, E. S., 80, 82
 Holly, F. W., 150 (ref. 13), 152 (ref. 15), 157 (refs. 15, 28), 158 (ref. 28), 160 (ref. 31), 165
 Holmberg, C. G., 30, 32 (ref. 140), 43, 113 (ref. 57), 120
 Holmes, 371 (ref. 212), 440
 Holzer, H., 190 (ref. 99), 200 (ref. 134), 201 (ref. 134), 202 (ref. 134), 219, 220
 Homan, J. D. H., 34 (ref. 141), 43
 Honorato, R., 26 (ref. 142), 43
 Hooper, I. R., 149 (ref. 12), 150 (ref. 12), 151 (ref. 14), 165
 Hoover, S. R., 249, 301, 311, 476 (ref. 3), 481
 Hopkins, C. Y., 263, 316
 Hopkins, F. G., 51, 82, 268, 291, 316
 Hopkins, S. J., 449, 459, 467, 483
 Hoppe-Seyler, F., 316, 483
 Hori, E., 170, 217
 Horiuchi, K., 86 (ref. 58), 120
 Horn, M. J., 284, 317
 Hornung, T., 275, 293, 320
 Horowitz, N. H., 274, 317
 Horsfall, J. G., 476, 482
 Horton, E., 100 (ref. 11), 119
 Horváth, S., 267, 317
 Hotta, R., 86 (ref. 59), 120
 Hove, E., 96 (ref. 60), 101 (ref. 60), 104 (ref. 60), 120
 Howard, W. L., 373 (ref. 87a), 436
 Howe, M., 293, 321
 Howell, S. F., 255, 317
 Howell, W. H., 2, 6, 23, 43
 Hoyle, L., 52-55, 58, 60, 71, 74-76, 81
 Hudemann, S., 22, 43
 Hudson, C. S., 132, 133 (ref. 30), 134 (ref. 28), 136, 142, 143
 Huffman, H. M., 276, 313
 Hughes, W. L., Jr., 22 (ref. 62), 29 (ref. 62), 30 (ref. 61), 41
 Hundeshagen, R., 474, 483
 Hunter, 262
 Hunter, F. E., 183-185, 190 (ref. 70, 106), 215 (ref. 70), 219, 220
 Hurn, M., 27 (refs. 195, 196), 38, 43, 45
 Hutchings, B. L., 164 (ref. 43), 166, 249, 321
 Hutchinson, E. A., 164 (ref. 45), 166
 Hutchinson, H. B., 451, 484
 Hutton, W. E., 446 (ref. 82), 449 (ref. 82), 454, 455, 458 (ref. 82), 483
- I
- Illman, W. I., 474, 484
 Imai, H., 410, 435
 Imelik, B., 446, 466, 467, 469, 470, 473 (ref. 83), 483
 Ingelman, B., 34 (ref. 132), 35 (refs. 132, 148), 43
 Irving, A. A., 407 (ref. 88), 436
 Isbell, H. S., 132, 142
 Isjurova, A., 451, 465, 483
 Issatshenko, B. L., 451, 483
 Ivanov, N. N., 432, 436
 Ivanova, V. E., 432, 436
 Ivánovics, G., 267, 317
 Iwanoff, 305
 Iwatasuru, R., 86 (ref. 61), 120
- J
- Jackson, E. L., 133 (ref. 30), 142
 Jackson, E. R., 87 (ref. 54), 120
 Jackson, H., 383, 385, 387, 429 (ref. 90), 436
 Jacob, E., 260, 318
 Jacobs, S. E., 452, 457, 462 (ref. 89), 466, 469 (ref. 89), 483
 Jacobsen, E., 85 (ref. 62), 86 (ref. 62), 102 (ref. 62), 120
 Jacobsohn, K. P., 86 (refs. 83a, b, 84), 120, 191, 192, 194, 220
 Jacobson, L. O., 37 (ref. 1), 39
 Jacox, R. F., 27 (ref. 149), 43
 Jaffé, M., 466 (ref. 90), 477, 483
 James, W. O., 383, 385 (refs. 11, 91), 387, 429 (ref. 92), 434, 436, 437
 Janigen, E. G., 93 (ref. 68), 120
 Janke, A., 232, 317
 Jankowski, G. J., 479, 483
 Janouch, M., 94 (ref. 77), 95 (ref. 77), 99 (ref. 77), 105 (ref. 77), 113 (ref. 77), 120
 Jansen, 243
 Jansen, E. F., 367 (ref. 93), 368 (ref. 93), 437
 Jaques, L. B., 4, 15, 19, 29, 30 (ref. 152), 32-34, 35 (ref. 65), 37, 40, 41, 43, 44
 Jarisch, A., 296, 317
 Jeffrey, R. N., 372, 436
 Jeffreys, C. E. P., 313
 Jenkins, E. H., 355 (ref. 94), 363, 371 (ref. 94), 378, 437

- Jennen, R. G., 177, 218
 Jenner, H. D., 100, 113 (ref. 63), 120
 Jensen, C. O., 343, 353 (ref. 96), 420-422, 433 (ref. 95), 437
 Jensen, H., 336 (refs. 97, 98), 413, 415, 416, 437
 Jensen, H. L., 449, 450, 474, 483
 Jensen, R., 34 (refs. 159, 287), 44, 47
 Jentsch, A. B., 453, 483
 Jeremin, G. P., 320
 Jetta, G., 367 (ref. 99), 369, 437
 Jezl, J., 447 (ref. 96), 465 (ref. 96), 483
 Jiminès-Vargas, J., 104 (ref. 79), 120
 Joergensen, A. C. P., 415, 437
 Johansen, G., 250, 319
 John, H. M., 221 (ref. 160), 222
 Johnson, A. B., 238, 321
 Johnson, E. F., 373 (ref. 101), 437
 Johnson, F. H., 447, 457, 458, 461 (ref. 97), 465 (ref. 97), 471 (ref. 97), 473 (ref. 97), 484
 Johnson, J., 336 (ref. 102), 356, 415, 416, 420, 437
 Johnson, J. R., 257, 317
 Johnson, P., 29 (ref. 160), 44
 Johnson, S. W., 377 (ref. 105), 437
 Johnson, W. A., 168 (ref. 2), 193 (ref. 122), 217, 220
 Jolliffe, L. S., 12, 45
 Jones, D. B., 284, 317
 Jones, E. P., 332 (ref. 45), 334 (ref. 45), 353 (ref. 45), 354 (ref. 45), 355 (ref. 45), 399 (ref. 45), 400 (ref. 45), 401, 402 (ref. 45), 403-408, 422, 423, 425, 435
 Jones, M. J., 275, 317
 Jones, W. G. M., 234, 317
 Jörgensen, 299
 Jorpes, E., 34, 44
 Jorpes, J. E., 1 (ref. 162), 34, 44
 Jouravsky, G. I., 338 (ref. 106), 339 (ref. 106), 374 (ref. 106), 414, 437
 Jühling, L., 32 (ref. 163), 33 (ref. 163), 44
 Jukes, T. H., 249, 318
 Jung, 261
 Jusatz, H., 312
- K**
- Kabat, E. A., 93 (ref. 64), 120
 Kagan, B. O., 123 (ref. 31), 141 (ref. 31), 142
 Kalabina, M., 463, 484
 Kalcar, H. M., 128 (ref. 32), 142, 189 (ref. 94), 190 (ref. 104), 219, 220
 Kalinenko, V. O., 475, 484
 Kalnitsky, G., 216, 221, 312
 Kamen, M. D., 172, 218
 Kaneko, T., 242, 311
 Kapilash, G. P., 454 (ref. 220), 486
 Kaplan, N. O., 123 (ref. 6), 126, 138 (ref. 6), 142, 221, 222
 Kar, B. C., 282, 315
 Karabinos, J. V., 34 (ref. 323, 325), 49
 Karaoglanov, Z., 232, 317
 Karrer, P., 394, 437
 Kaserer, H., 446 (ref. 101), 449 (ref. 101), 454, 455 (ref. 101), 484
 Kashirin, S., 338 (ref. 197), 366, 433 (ref. 170), 439
 Kassell, B., 284, 286, 301, 313, 317
 Katz, J., 127 (ref. 33), 142
 Kauer, G. L., 10 (ref. 35), 40
 Kay, H. D., 83 (refs. 47, 65), 84, 85, 86 (ref. 100), 87 (ref. 47), 100, 106 (ref. 65), 113 (ref. 63), 120, 121
 Kazal, L. A., 5, 24, 44
 Kegel, 473, 484
 Keilin, D., 61 (ref. 37), 82
 Kekwick, R. A., 22, 30, 44
 Keller, O., 34 (ref. 323), 49
 Kendal, L. P., 383, 385, 387, 429 (ref. 90), 436
 Kendall, E. C., 230
 Kennedy, E. P., 189 (ref. 144), 214, 215 (ref. 145), 220
 Kennedy, T. H., 260, 317
 Kenton, H. B., 31 (ref. 169), 44
 Kenyon, R. L., 370, 437
 Keppel, D. M., 322
 Kertész, Z., 367, 368 (ref. 109), 437
 Keskin, H., 182 (ref. 68), 215 (ref. 68), 219
 Keston, A. S., 319
 Killian, H., 250, 317
 Kilmer, G. W., 241, 280, 322
 King, C. G., 295, 314
 King, E. J., 91 (ref. 3), 92 (refs. 2, 2a-c), 93 (ref. 2c), 94 (refs. 37, 66b), 95 (ref. 66a), 100 (ref. 2c), 101 (ref. 2a), 104 (ref. 1), 109, 111 (ref. 2c), 113 (ref. 66), 115, 118, 119, 120
 Kingsbury, A. W., 407, 437
 Kirchner, J. G., 242, 316
 Kirpilianov, G. I., 366 (ref. 65), 436
 Kirschon, A., 37 (ref. 1), 39
 Kissling, R., 370 (ref. 112), 371 (refs. 112, 113), 372 (refs. 112, 113), 377 (ref. 111), 414, 437
 Kiun, T. P., 315
 Klein, L., 377 (ref. 114), 437
 Kleinzeller, A., 177, 218
 Klemm, L. H., 151 (ref. 14), 165
 Klenk, E., 466 (ref. 201), 477, 486
 Klinger, R., 52, 82

- Klotz, I. M., 14, 44
 Kluyver, A. J., 233, 317, 484
 Knight, 246
 Knoop, F., 167, 169, 173, 180 (ref. 3),
 217, 218
 Knoop, R., 477, 484
 Knox, R., 231, 317
 Knox, W. E., 188 (ref. 90), 219, 430,
 437
 Kobel, M., 367, 368, 373 (refs. 149,
 151), 374 (refs. 149-151), 414, 415,
 434 (ref. 149), 438
 Koebke, K., 430 (ref. 240), 440
 Koelle, 230
 Kögl, F., 246-249, 317
 Kohler, A. R., 164 (ref. 43), 166
 Kohmann, E. F., 259, 317
 Kolb, J. J., 241, 270, 272, 273, 321
 Kolenev, A. H., 370 (ref. 118), 377
 (ref. 118), 413, 414, 437
 Koller, J. B. C., 332 (ref. 119), 409,
 410, 437
 Koncz, A., 338 (ref. 71), 436
 König, C. J., 410, 437
 König, P., 284, 373 (ref. 117), 374 (ref.
 117), 434, 437
 Kokes, 301
 Koningsberger, V. J., 247, 320
 Koniuszy, F., 236, 315
 Korenzwit, A., 234, 317
 Kornberg, A., 201 (ref. 135), 202 (ref.
 135), 204, 205, 207 (ref. 135), 220
 Kosar, W. F., 260, 321
 Koser, S. A., 432 (ref. 121), 437
 Köster, H., 95 (ref. 67), 120, 304, 312
 Kósutany, T., 367 (ref. 122), 378, 388
 (ref. 122), 437
 Kotasthane, 284
 Kourilo, M., 373 (ref. 123), 437
 Kozlowski, A., 293, 317
 Kramer, E., 93 (ref. 68), 120
 Krause, W. W., 296, 317
 Kraybill, H. R., 363, 378, 437
 Krebs, H. A., 56, 57, 82, 168, 169, 173,
 174, 175 (ref. 20), 178, 180 (ref. 20),
 192, 193, 196, 217, 218, 220, 244, 317
 Krewson, C. F., 330 (ref. 35), 347 (refs.
 35-37), 348 (ref. 36), 373 (refs. 35-
 37, 125), 374 (ref. 36), 435, 437
 Kriukova, N., 126 (refs. 34, 35), 142,
 143
 Krumey, F., 85 (ref. 125), 87 (ref. 124),
 91 (ref. 125), 119, 122
 Krupa, G., 164 (ref. 43), 166
 Kubowitz, F., 116, 120
 Kuehl, F. A., 147 (refs. 6, 7), 149 (refs.
 9, 10), 151 (refs. 9, 10), 152 (ref. 15),
 153 (refs. 16, 17), 154 (refs. 16-18,
 20), 155 (refs. 16, 17, 22, 24, 25), 157
 (refs. 15, 18, 27, 28), 158 (ref. 28),
 165
 Kugelmass, I. N., 4, 44
 Kuhn, 284
 Kühne, P., 250
 Kühne, W., 51, 82
 Kuizenga, M. H., 34, 44
 Kunitz, M., 12 (ref. 189), 45
 Kurgatnikow, 284
 Kurssanov, A., 126 (refs. 35, 42), 143
 Kurssanov, A. L., 126 (ref. 34a), 142
 Kushner, S., 164 (ref. 43), 166
 Kutscher, W., 95, 119
 Kutz, R. L., 30 (ref. 103), 42
 Kutznetsow, S. I., 463 (ref. 42), 483

L

- Labaw, L. W., 255, 317
 Laki, K., 10, 30, 31, 44
 Lakon, G., 276, 317
 Lam, C. R., 27 (ref. 229), 46
 Lampen, J. O., 275, 317
 Lantzsck, K., 456 (ref. 105), 484
 Larianova, N. N., 432, 436
 Laromiguière, S. de, 95 (refs. 108a, b),
 96 (refs. 108a, b), 97 (ref. 108b), 101
 (ref. 108b), 105 (ref. 108b), 121
 Larsen, H., 30 (ref. 71), 41
 Larson, C. E., 15, 44
 Larson, P. S., 429, 433 (refs. 52-54, 78,
 126), 435, 436, 437, 438
 Latker, S. N., 123 (ref. 31), 141 (ref.
 31), 142
 Latreille, M., 87 (ref. 109), 90 (ref.
 109), 121
 Laurens, A., 95 (refs. 108a, b), 96 (refs.
 108a, b), 97 (ref. 108b), 101 (ref.
 108b), 105 (ref. 108b), 121
 Lavers, C. G., 474, 484
 Lavine, T. F., 282, 283, 317, 321
 Lawrence, C. A., 253, 317
 Lawson, A., 261, 317
 Leathes, J. B., 19 (ref. 177), 44
 Leavenworth, C. S., 385 (refs. 222-
 224), 395 (refs. 222-224), 407 (ref.
 224), 440
 Lebedew, A., 126 (ref. 36), 143
 Lebel, H., 14, 44
 Lechevalier, H. A., 164, 166
 LeCompte, S. B., Jr., 372, 438
 Lederberg, J., 124 (ref. 12), 141 (ref. 12),
 142
 Lee, J., 34 (ref. 323), 49
 Lee, M., 444 (ref. 107), 462, 474 (ref.
 107), 484
 Lee, S. B., 309, 317

Le Fennine, P. V., 164 (ref. 43), 166
 Legler, R. G., 5, 19, 30 (ref. 179), 44
 Lehmann, H., 78 (ref. 45), 82
 Lehmann, K. B., 434 (ref. 133), 438
 Lehninger, A. L., 185, 186, 187 (ref. 84), 189 (ref. 144), 214, 215 (refs. 145, 146), 216, 219, 220
 Leloir, L. F., 183-186, 190 (ref. 70), 215 (ref. 70), 219
 Lemieux, R. U., 145 (ref. 1), 155, 164, 165
 Lemoigne, M., 276, 295, 317
 Lenggenghager, K., 6, 9, 10 (ref. 182), 12, 15, 38, 44
 Lens, J., 34 (ref. 141), 43
 Leonhardt, H., 191 (ref. 112), 193, 220
 Leonian, L. H., 249, 318
 Leopold, W., 312
 Létard, H., 6, 44
 Leuillot, G., 336 (ref. 31), 435
 Levene, P. A., 85 (ref. 70), 86 (ref. 70), 120, 243
 Lewis, H. B., 262, 273, 318
 Lewis, J. H., 27 (ref. 100), 42
 Li, Lien Piao, 375 (ref. 134), 438
 Liang, P., 176, 218
 Libérthson, L., 444 (ref. 108), 474, 484
 Lichstein, H. C., 70 (ref. 40), 82
 Lieben, F., 268, 318
 Liébercq, C., 216, 217, 221
 Lilly, V. G., 249, 318
 Lindau, 298
 Linderstrøm-Lang, K., 277
 Lindley, H., 287, 318
 Lindquist, J. N., 6, 48
 Lineweaver, H., 302, 311
 Link, K. P., 18, 20, 41, 44
 Lipman, C. B., 451, 462 (ref. 109), 484
 Lipmann, F., 128 (ref. 37), 143, 185, 188 (ref. 143), 189, 190 (ref. 103), 219, 220, 221, 222
 Lockett, W. T., 463 (ref. 50), 482
 Loeb, A., 186 (ref. 77), 188, 219
 Loew, O., 374 (ref. 135), 388 (ref. 135), 412, 415, 438
 Logemann, W., 276, 312
 Loginowa, L. G., 318
 Lohmann, K., 95 (ref. 71), 120, 244
 Loker, F. F., 26, 40
 Long, C., 180, 181, 219
 Long, L. M., 163 (ref. 41), 166
 Longenecker, J. B., 351, 436
 Loo, Y. H., 147 (ref. 5), 149 (ref. 12), 150 (ref. 12), 165
 Loomis, E. C., 20, 21, 26 (ref. 278), 45, 47
 Lozner, E. L., 10 (ref. 237), 12, 45, 46
 Lu, P., 278, 322

Ludewig, S., 14, 41
 Ludwig, B., 15 (ref. 120), 43
 Lugg, J. W. H., 76 (ref. 41), 82, 270, 318
 Lummer, H. D., 312
 Lüttgens, W., 116, 120
 Lynen, F., 172, 173, 174 (refs. 13, 29, 30), 175 (refs. 13, 34), 176 (ref. 39), 178 (refs. 22, 26), 179, 180, 184 (ref. 73), 189 (ref. 98), 190, 199, 200 (refs. 133, 134), 201 (refs. 133, 134), 202 (refs. 133, 134), 203, 204, 206 (ref. 133), 218, 219, 220, 296, 322
 Lyons, R. L., 33, 40
 Lyubimova, M. N., 98 (ref. 40), 119

M

McAnally, 278
 McBride, T. J., 12 (ref. 296), 48
 McCready, R. M., 129 (ref. 38), 143
 McCullom, W. J., 475 (ref. 162), 485
 McDonald, M. R., 12 (ref. 189), 45
 MacDonnell, L. R., 367 (ref. 93), 368 (ref. 93), 437
 McElroy, L. W., 249, 318
 MacFarlane, M., 85 (ref. 72), 89 (ref. 72), 120
 MacIntosh, F. C., 34 (ref. 192), 45
 McKee, H. S., 407 (ref. 137), 438
 McKinstry, D. W., 418, 419, 421, 438, 439
 McLean, F. C., 14, 47
 McLean, J., 34 (ref. 325), 49
 MacMahon, M. T., 22, 41
 McMeekin, T. L., 283, 318
 MacMillan, R. L., 27, 45
 McMurtrey, J. E., Jr., 327 (ref. 139), 438
 McNeely, W. H., 34 (ref. 325), 49
 McSwain, B., 10 (ref. 35), 40
 Macchia, E., 54, 82
 MacDonald, A. G., 15, 44
 MacFarlane, R. G., 7, 19 (ref. 191), 20 (ref. 34), 35 (ref. 190), 40, 45
 Machado, A. L., 221 (ref. 165), 222
 Mackay, M. E., 22 (ref. 168), 30 (ref. 168), 44
 Mackowiak, E. J., 37 (ref. 193), 45
 Mackworth, J. F., 301, 318
 Maclay, W. D., 133 (ref. 30), 142
 Macy, 284
 Maddock, S. J., 95 (ref. 134), 122
 Madinaveitia, J., 69 (ref. 43), 82
 Magath, T. B., 27 (ref. 195), 45
 Maillard, L. G., 408 (ref. 136), 438
 Malachowski, R., 193 (ref. 120), 220
 Maliyantz, A. A., 444 (ref. 110), 451, 484

- Maloeuf, N. S. R., 291, 318
 Mandl, I., 232
 Mangubi, B. V., 454, 486
 Mann, F. D., 27 (refs. 195, 196), 38
 (ref. 147), 43, 45
 Mannich, 258
 Marchand, B., 312
 Marenzi, A. D., 284
 Marquardt, U., 262, 267, 320
 Marsal, A., 91 (ref. 31a), 92 (ref. 31b),
 93 (ref. 31b), 119
 Marschek, Z., 338 (ref. 9), 372 (ref. 9),
 434
 Marsland, D. A., 452, 484
 Martin, A. J. P., 59, 80, 81
 Martius, C., 167, 169, 172, 173, 180
 (refs. 3, 59), 181 (ref. 59), 184 (ref.
 59), 190 (ref. 59), 191, 192 (ref. 108),
 193, 194 (ref. 125), 195 (refs. 108,
 125), 196 (ref. 125), 197 (ref. 125),
 198, 199, 213 (ref. 59), 214 (ref. 147),
 215 (ref. 147), 216, 217 (ref. 156),
 217, 218, 219, 220, 221 (ref. 59), 221
 Martland, M., 86 (ref. 73), 91 (ref.
 73), 104 (ref. 73), 120
 Marvel, 273
 Marx, R., 15 (ref. 120), 43
 Maschmann, E., 104 (ref. 74), 116 (ref.
 74), 120
 Masket, A. V., 14, 41
 Maslowski, M., 193 (ref. 120), 220
 Masoni, G., 449 (refs. 54, 55), 454, 465,
 482
 Massart, L., 97 (ref. 75), 99 (ref. 75),
 105 (ref. 75), 113 (ref. 75), 120
 Mast, L. R., 225, 318
 Mast, S. O., 225, 318
 Matthews, A., 451, 452 (ref. 112), 453
 (ref. 112), 457, 461, 462 (ref. 112),
 463, 484
 Mawson, C. A., 27, 45
 Mayer, K., 87 (refs. 140, 141), 122
 Mayer, P., 283, 319
 Mayrhofer, O. I., 179 (ref. 57), 218
 Mazé, P., 224, 318
 Mazur, A., 270, 318, 482
 Mead, T. H., 293, 316
 Meagher, W. A., 129 (ref. 39), 143
 Means, T., 336, 441
 Medes, G., 176, 177, 182, 184 (ref. 69),
 187, 188, 213, 219
 Meek, J. S., 149 (ref. 12), 150 (ref. 12),
 165
 Mehler, A. H., 201 (ref. 135), 202 (ref.
 135), 204, 205, 207 (ref. 135), 220
 Meisenheimer, M., 83 (ref. 20), 84, 112
 119
 Meldrum, N. U., 309, 318
 Melin, M., 22 (refs. 62, 228), 29 (ref.
 62), 41, 46
 Mellanby, J., 9, 10, 12, 19 (ref. 177),
 21, 26, 38, 44, 45
 Melville, D. B., 316, 322
 Melville, J., 385 (ref. 177), 395 (ref.
 177), 439
 Memmen, F., 84 (refs. 147, 149), 122
 Menke, W., 260, 318
 Menten, M. L., 94 (ref. 77), 95 (ref.
 77), 99 (ref. 77), 105 (ref. 77), 113
 (ref. 77), 120
 Mertz, E. T., 20, 22, 45
 Meusel, W., 295, 318
 Meyer, 277
 Meyer, J., 312, 320
 Meyer, K., 236, 318
 Meyerhof, O., 106 (ref. 78), 107, 120,
 128 (ref. 40), 143, 215 (ref. 149), 221
 Mezzadrolì, G., 279, 318
 Michaelis, M., 432 (ref. 154), 438
 Micheel, F., 237, 273, 318
 Michel-Lila, O., 103 (ref. 116), 109,
 110 (ref. 116), 121
 Miciol, M., 410, 438
 Miehler, H., 20 (ref. 74), 41
 Mihaïlovici, I., 336 (ref. 141), 338
 (ref. 141), 438
 Mihalyi, E., 31 (ref. 175), 44
 Milham, M., 37 (ref. 1), 39
 Milhau, O., 104 (ref. 117), 121
 Miller, H. E., 192 (ref. 117), 220
 Miller, H. K., 273, 293, 322
 Miller, M., 444 (ref. 74), 451, 472, 483
 Miller, S. G., 29 (ref. 211), 45
 Miller, Z. B., 312
 Millington, R., 173, 218
 Mills, C. A., 2, 4, 6, 45
 Milne, G. R., 474, 484
 Milstone, H., 21, 32 (ref. 204), 45
 Milstone, J. H., 11, 15, 17 (ref. 205a),
 28, 30 (ref. 205), 45
 Mindler, A. B., 407, 437
 Minot, G. R., 30 (ref. 206), 45
 Mitchell, J. W., 246, 318
 Miyoshi, M., 445, 484
 Mogilevskii, G. A., 449 (ref. 115),
 455, 484
 Moldtmann, H. G., 312
 Molinari, E., 434 (refs. 142, 143), 438
 Möller, E. F., 276, 322
 Mommaerts, W. F. H. M., 31, 32, 44
 Monche, J., 104 (ref. 79), 120
 Monguillon, P., 276, 295, 317
 Monkhouse, F. C., 37, 45
 Monod, J., 124 (ref. 41), 141 (ref. 41),
 143
 Moog, F., 83 (ref. 80), 84, 120

- Moore, D. H., 34 (ref. 60), 41
 Moore, F. W., 463, 484
 Morawitz, P., 2, 15, 45
 Morgan, E. J., 277, 316, 319
 Morganstern, M., 250, 319
 Morii, M., 87 (ref. 81), 120
 Moroz-Morozenko, M. G., 345, 439
 Morrison, A. L., 319
 Morrison, G. A., 66, 82
 Morrison, P. R., 23 (ref. 210), 29 (ref. 211), 30, 31, 32 (ref. 102), 42, 45
 Morse, W. I., 27, 41
 Morton, H. E., 453, 484
 Mosca, T. F., 415, 438
 Moser, H., 85 (ref. 56), 95 (ref. 56), 120
 Mosiman, H., 34 (ref. 132), 35 (ref. 132), 43
 Mothes, K., 224, 226, 291, 319
 Moubasher, R., 307, 315
 Mourgue, M., 116, 121, 288, 319
 Moyer, A. W., 322
 Moyer, L. S., 282, 311
 Mozingo, R., 68, 82, 150 (ref. 13), 152 (ref. 15), 157 (refs. 15, 28), 158 (ref. 28), 160 (ref. 31), 165, 248, 316
 Mulford, D. J., 22 (ref. 62), 29 (ref. 62), 41
 Müller, A., 444 (ref. 148), 445 (ref. 148), 473, 485
 Muller, A. E., 270, 274, 320
 Müller, G., 108, 109 (ref. 9), 111 (ref. 9), 115 (ref. 9), 116 (ref. 9), 118 (ref. 9), 119
 Müller, R., 430 (ref. 241), 440
 Müller-Thurgau, 363, 438
 Mundive, 284
 Munemura, S., 84 (ref. 82), 86 (ref. 82), 120
 Muñoz, J. M., 186, 219
 Munro, F. L., 21, 23, 27 (refs. 212, 213), 29, 40, 45
 Munro, M. P., 21, 23, 27 (refs. 212, 213), 45
 Münz, E., 454, 446 (ref. 118), 449 (ref. 119), 454, 455, 458 (ref. 118), 460, 465, 484
 Murphy, R. C., 25 (refs. 214, 305), 26 (ref. 214), 45, 48
 Muus, J., 14, 44
 Mylon, E., 35 (ref. 215), 45
 Mynchenberg, G., 6 (ref. 203), 45
 Myrbäck, K., 103 (ref. 43), 120
- N
- Nachmansohn, D., 221, 222
 Nafziger, H., 312
 Naghski, J., 330 (ref. 35), 347 (refs. 35, 37), 373 (refs. 35, 37, 146), 416, 417, 433 (ref. 166a), 435, 438, 476, (ref. 3), 481
 Nagy, L., 338 (ref. 20), 402 (ref. 20), 434
 Nahm, H., 182 (ref. 62), 219
 Nakayama, J., 6 (ref. 203), 45
 Nance, M. H., 20, 21 (ref. 88), 23-26, 42
 Nanninga, L. B., 1 (ref. 217), 29, 30, 33, 45
 Narayana, 284
 Nasset, F. S., 356 (ref. 81), 433 (ref. 81), 436
 Naundorf, G., 247, 311
 Neave, S. L., 478, 479, 484
 Neciullah, N., 173, 178 (ref. 22), 218
 Needham, J., 78 (ref. 45), 82
 Neisser, M., 52, 74, 82
 Nelson, E. K., 192, 220
 Nelson, J., 374, 434, 439
 Nencki, M., 51, 82
 Nenjukow, S. S., 262, 319
 Nessler, J., 332, 336 (ref. 147), 378, 388 (ref. 147), 410, 438
 Neubauer, O., 477, 484
 Neuberger, C., 86 (refs. 83a, b, 84), 87 (ref. 85), 120, 126 (ref. 2), 142, 174 (ref. 28), 218, 232, 238, 260, 283, 310, 311, 319, 367, 368, 373 (refs. 149, 151), 374 (refs. 149-151), 402 (ref. 152), 414, 415, 434 (refs. 148, 149), 438
 Neuberger, A., 277, 319
 Neumaerker, H., 466 (ref. 122), 477, 484
 Nichol, C. A., 432 (ref. 154), 438
 Nickerson, W. J., 254, 319
 Nicol, H., 445 (ref. 123), 484
 Nicolet, 271
 Nieft, M., 32 (refs. 280, 281), 47
 Nielsen, N., 250, 319
 Nielsen, P. H., 38, 46
 Nier, A. O., 169, 172, 196 (ref. 15), 218
 Niethammer, A., 238, 319
 Nightingale, G. T., 319
 Nijholt, J. A., 401, 406, 407, 438
 Noda, L., 177, 218
 Nolf, P., 3, 8, 13, 25, 30, 46
 Nord, F. F., 230
 Nordbö, R., 13, 14, 46
 Norris, D., 453 (ref. 124), 457 (ref. 124), 484
 Novelli, G. D., 221, 222, 448 (ref. 125), 451 (refs. 125, 126), 457 (ref. 125), 459, 484

Novogrudski, D., 444 (ref. 127), 475,
484
Nowotny, E., 112, 113 (ref. 21a), 117,
119
Noyce, B. N., 188 (ref. 90), 219

O

Obabko, V. A., 375, 411, 417, 438
Ochoa, S., 179, 188 (ref. 128), 189,
190, 197 (ref. 128), 199, 200, 201
(refs. 102, 135), 202-209, 210 (ref.
132), 211, 212, 213 (ref. 132), 214,
219, 220, 221, 222
Ochoai, E., 86 (ref. 86), 121
Oettingen, W. F. v., 452, 466 (ref. 213),
469, 477 (ref. 211), 478, 486
Ogden, W. B., 356, 437
Ogg, C. L., 376 (refs. 157, 245), 438, 441
Ogston, A. G., 197, 220
Ohliger, P. H., 34 (ref. 323), 49
Ohmori, Y., 121
O'Kane, D. O'E., 62, 82
Olin, S. M., 158 (ref. 29), 159, 165
Olson, K. B., 34, 41
Olson, O., 351, 356 (ref. 81), 433 (ref.
81), 436
Olwin, J. H., 27 (ref. 83), 42
Oncley, J. L., 22 (ref. 223), 30 (ref.
61), 41, 46
O'Neal, W. J., 27 (ref. 229), 46
Oparin, A., 126 (ref. 42), 143
Opotzki, W. F., 235, 319
Orlova, S. I., 450, 485
Orzechowski, G., 295, 318
Osnitskaya, L. K., 445, 462, 467 (ref.
128), 472, 484
Ott, J. J., 369 (ref. 21), 413 (ref. 21),
434
Ottenstein, B., 367 (ref. 152), 402 (ref.
152), 438
Owades, P., 273, 322
Owen, C. A., Jr., 26 (ref. 308), 27, 37,
46, 48
Owren, P. A., 1 (ref. 233), 3, 5 (ref.
233), 6, 11, 18, 20, 22, 24-26, 28, 29,
30 (ref. 233), 46

P

Pace, D. M., 225, 318
Page, E. W., 12, 43
Page, R. C., 19 (ref. 235), 46
Pages, 1
Paget, M., 85 (ref. 88), 121
Palfray, L., 370 (ref. 158), 438
Pallade, G. E., 215 (ref. 148), 220
Pálos, L. A., 23, 46

Panouse, J., 366 (ref. 186), 439
Parfentjev, A., 10, 46
Parish, H. J., 453, 484
Parmele, H. B., 343, 353 (ref. 96), 420-
422, 437
Pasteur, L., 410
Patterson, L. B., 85 (ref. 72), 89 (ref.
72), 120
Patterson, W. I., 243, 271, 319, 322
Patton, T. B., 16, 46
Patwardhan, V. N., 87 (ref. 89), 121
Pearsall, W. H., 407 (refs. 159, 160),
438
Peat, S., 234, 317
Peck, R. L., 147 (refs. 6, 7), 149 (ref.
11), 150 (ref. 13), 155 (refs. 24, 25),
162 (ref. 38), 164 (ref. 46), 165, 166
Peel, E. W., 149 (ref. 11), 150 (ref. 13),
155 (refs. 24, 25), 165
Pelczar, Jr., 249
Percival, E. G. V., 235, 314
Perlmann, G. E., 91 (ref. 90), 121
Perlzweig, W. A., 477 (ref. 70), 478,
483
Permin, P. M., 1 (ref. 239), 22, 30 (ref.
239), 39, 40, 46
Perrier, A., 462, 484
Peter, M., 444 (ref. 197), 445, 456, 458,
460, 461 (ref. 197), 465, 471, 486
Peters, R. A., 180, 181, 189 (ref. 97),
216, 217, 219, 221, 319
Peterson, W. H., 234, 249, 317, 321, 323
Peterson, W. J., 470 (ref. 67), 483
Petrik, S. M., 338 (ref. 161), 339 (ref.
161), 343 (ref. 205), 349 (ref. 205),
367 (ref. 161), 438, 440
Patt, L. B., 85 (ref. 91), 100 (ref. 91),
105 (ref. 91), 113 (ref. 91), 121, 294,
319
Pfankuch, E., 85 (ref. 92), 121, 294,
298
Pfitzer, 245
Philips, 230
Phillips, H., 287, 318
Pickering, S. V., 451, 484
Pidacks, C., 164 (ref. 43), 166
Pigman, W. W., 132, 142
Pillar, R. K., 100 (ref. 93), 121
Pilling, J., 35 (ref. 190), 45
Pinat, R., 410, 438
Piper, J., 34, 35, 36 (ref. 299), 46, 48
Piper, S. H., 444 (ref. 26), 478 (ref.
26), 482
Plass, M., 204 (ref. 141), 208, 213 (ref.
141), 220
Platt, S. B., 385 (ref. 163), 438
Plimmer, R. H., 86 (ref. 94), 87 (ref.
94), 121

- Plotho, O. v., 432, 438
 Plum, P., 30 (ref. 71), 41
 Pohl, A., 175 (ref. 34), 218
 Poland, 304
 Polglase, W. J., 151 (ref. 14), 160 (ref. 30), 161 (ref. 33), 165
 Pollard, N., 247, 321
 Pollock, M. R., 231, 317
 Pomeroy, R., 479 (ref. 135), 484
 Popoff, L., 478, 484
 Popoff, N., 338 (ref. 165), 339 (ref. 165), 438
 Porsche, J. D., 30 (ref. 103), 42
 Porter, 249
 Porter, W. L., 373 (ref. 166), 433 (ref. 166a), 438
 Potter, A. L., 124 (ref. 12), 129 (refs. 23, 43), 136 (ref. 23), 141 (ref. 12), 142, 143
 Potter, V. R., 198, 220
 Prater, A. N., 242, 316
 Pratt, R., 254, 319
 Preiss, W., 402 (ref. 167), 438
 Prescott, F., 248, 250, 312
 Prescott, S. C., 409 (ref. 168), 439
 Preuss, 231
 Probst, O., 179, 218
 Pucher, G. W., 327 (ref. 169), 340 (ref. 169), 370 (ref. 220), 371 (ref. 220), 377 (ref. 220), 385 (refs. 218-224), 395 (refs. 218-224), 405, 407 (ref. 224), 439, 440
 Pulaski, E. J., 453, 484
 Pulver, R., 78, 82
 Purves, C. B., 132, 143
 Putman, E. W., 124 (ref. 12), 139 (ref. 46), 141 (ref. 12), 142, 143
 Putz, E., 85 (ref. 56), 95 (ref. 56), 120
 Pyatnitskii, M., 433 (ref. 170), 439
 Pyriki, C., 327 (ref. 173), 338 (ref. 173), 353 (ref. 171), 370, 374 (ref. 173), 402 (ref. 172), 439
- Q
- Quagliariello, G., 86 (ref. 95), 121
 Quastel, J. H., 174, 218, 311
 Quick, A. J., 2, 3, 7, 10-12, 14, 15, 18, 19 (ref. 247), 20, 24, 26, 27, 30, 35 (ref. 65), 41, 43, 46
 Quivy, D., 5, 19 (ref. 33), 35 (refs. 32, 257), 37, 40, 46
- R
- Rabate, J., 94 (ref. 95a), 121
 Rachele, J. R., 241, 280, 322
 Rahn, O., 449, 459, 484
 Raistrick, H., 52, 82, 170, 217, 250
 Rajewski, B., 288, 319
 Randall, A., 27 (ref. 258), 47
 Randall, J. P., 27 (ref. 258), 47
 Randolph, N. A., 476 (ref. 134), 484
 Rane, L., 225, 319
 Ranganathan, 284
 Ransmeier, J. C., 14, 47
 Raper, H. S., 385 (ref. 83), 436
 Raper, L. O., 261, 319
 Rapoport, S., 19, 47
 Rau, 284
 Rauch, K., 176 (ref. 38), 218
 Rawlings, A. A., 314
 Rawn, A. M., 479, 484
 Raybin, H. W., 134, 135, 143
 Raymond, J., 99 (ref. 136), 122
 Rebstock, M. C., 149 (ref. 12), 150 (ref. 12), 163 (refs. 39, 40), 165, 166
 Reckendorfer, P., 238, 319
 Record, B. R., 22 (ref. 168), 30 (ref. 168), 44
 Reichel, C., 4, 5, 9-13, 15, 47, 48
 Reichel, M., 95 (refs. 133, 134), 100 (ref. 133), 122
 Reicheneder, F., 256, 316
 Reid, J. J., 402 (ref. 73), 418, 419, 421, 426 (ref. 74), 436, 438, 439
 Reifenberg, A., 343 (ref. 57), 388 (ref. 57), 414, 435
 Reifer, I., 385 (ref. 177), 395 (ref. 177), 439
 Reinfel'd, E. A., 451 (ref. 88), 483
 Reis, J., 87 (ref. 97), 121
 Renault, B., 484
 Reynolds, A., 308, 316
 Rice, F. A. H., 34 (ref. 324), 49
 Richards, M. M., 86 (ref. 98), 116, 121
 Richert, D. A., 22 (ref. 228), 46
 Ricker, A. G., 34 (ref. 156), 44
 Ridgway, C. A., 355 (ref. 178), 439
 Rieben, W. K., 1 (ref. 263), 19, 47
 Riedel, E., 84 (ref. 22), 90 (ref. 22), 99 (ref. 23), 119
 Rigdon, R. H., 35 (ref. 264), 47
 Rimington, C., 86 (refs. 99, 100), 121, 261, 317
 Rinderknecht, H., 319
 Rinehart, J. F., 315
 Ringer, M., 174 (ref. 28), 218
 Rink, M., 296, 322
 Ripke, O., 479, 483
 Rippel-Baldes, A., 230, 231, 319
 Risser, W. C., 34 (ref. 323), 49
 Rittenberg, D., 177, 218, 319
 Ritter, K., 299, 320
 Rivers, R. V. P., 287, 316
 Robb, T. P., 35 (ref. 65), 41

- Robbins, K. C., 21, 47
 Robbins, W. J., 313
 Robbins, W. R., 319
 Robbus, 246
 Roberts, A. C., 23 (ref. 266), 47
 Roberts, E. A. H., 346-348, 360, 373
 (refs. 179, 181, 182), 374 (refs. 179-
 182), 375, 381 (refs. 179-182), 383,
 387, 399, 417, 429 (ref. 92), 437, 439
 Roberts, F. Y., 193 (ref. 121), 220
 Roberts, W. L., 18 (ref. 48), 41
 Robinson, E., 374, 439
 Robinson, R., 319
 Robison, R., 85 (ref. 72), 86 (ref. 73),
 89 (refs. 72, 101a), 91 (refs. 73, 101),
 104 (ref. 73), 120, 121
 Robson, W., 273, 316
 Rocha e Silva, M., 39, 47
 Roche, J., 83 (ref. 102c), 84, 85 (refs.
 106, 114), 86 (ref. 104), 87 (ref. 109,
 114), 88 (refs. 102b, 104), 90 (ref.
 109), 91 (refs. 3, 30, 118b, 138a), 92
 (refs. 105, 118b), 93 (refs. 102c, 105,
 112b), 94 (ref. 102), 95 (refs. 108a, b),
 96 (refs. 108a, b, 115, 118, 118b), 97
 (refs. 103, 108b), 98 (ref. 107), 99
 (refs. 104, 112b, 115), 100 (refs. 104,
 112b, 118b), 101 (refs. 108b, 118a),
 103 (ref. 116), 104 (refs. 103, 113,
 117, 118b), 105 (refs. 108b, 111a, b),
 106 (refs. 104, 114, 137a), 107, 109,
 110, 111 (ref. 30), 113 (ref. 112a),
 114 (ref. 118b), 116, 118, 119, 121
 122, 288, 319
 Rockwood, E. W., 100 (ref. 119), 122
 Roedig, A., 176 (ref. 38), 218
 Roger, M., 91 (refs. 30, 118b), 92,
 93 (ref. 105), 96 (refs. 118, 118b),
 100 (ref. 118b), 101 (ref. 118a), 104
 (ref. 118b), 110, 111 (ref. 30), 114
 (ref. 118b), 116 (refs. 30, 105), 119,
 121, 122
 Rogers, G. S., 473, 484
 Rogers, T. H., 484
 Rogovskaya, C., 463, 484
 Rome, M. N., 20 (ref. 89), 42
 Rose, C. S., 316
 Rosenfeld, G., 39 (ref. 267), 47
 Rosenfeld, W. D., 448, 457 (ref. 139),
 484
 Rosenfield, R. E., 1, 47
 Rosenthal, C., 182, 183, 184 (ref. 67),
 188 (ref. 67), 219
 Rosner, L., 320
 Ross, A. F., 297, 320
 Roth, 245
 Routh, J. I., 275, 320
 Ruckdeschel, W., 408 (ref. 184), 439
 Rudolfs, W., 479, 484
 Ruffo, A., 109, 110 (ref. 120), 119, 122
 Runnström, J., 278, 320
 Russell, E. J., 451, 484
 Russell, H. K., 19 (ref. 235), 46
 Ryan, F. J., 286, 313
 Rydon, H. N., 71, 81
- S
- Sabetay, S., 366 (ref. 186), 370 (refs.
 158, 185), 438, 439
 Sabourin, L., 370 (ref. 158), 438
 Sahyun, M., 79, 82
 Saidel, L. J., 286, 313
 Saito, J., 52, 82
 Sakami, W., 177, 183, 184 (ref. 51), 185
 (ref. 74), 187, 218, 219
 Sakuma, S., 98 (ref. 145), 118, 122
 Salkowski, E., 51, 82
 Salkowski, H., 51, 82
 Salzer, W., 90 (ref. 24), 119
 Samec, M., 87 (ref. 141), 122
 Sanders, J. M., 444 (ref. 142), 478 (ref.
 142), 484
 Sanderson, M., 37 (ref. 1), 39
 Sanderson, R. T., 445 (ref. 143), 449
 (ref. 143), 455, 484
 Sandhoff, 231
 Sarles, H., 91 (ref. 121), 105 (refs.
 111a, b), 121, 122
 Sarma, S. N., 346 (ref. 182), 348 (ref.
 182), 373 (ref. 182), 374 (ref. 182),
 375 (ref. 182), 381 (ref. 182), 439
 Sartori, L., 91 (ref. 138a), 122
 Sartory, A., 320
 Schaad, R. E., 455 (ref. 40), 456, 482
 Schäffner, A., 84, 85 (refs. 123, 125),
 87 (refs. 123, 124), 91 (ref. 125), 95
 (refs. 123, 142), 119, 122
 Schaper, 293
 Scharpenak, A. E., 320
 Schatz, A., 146, 165
 Scheinberg, H., 30 (ref. 81), 42
 Schenck, J. R., 156 (ref. 26), 165
 Scherer, H., 199, 200 (ref. 133), 201 (ref.
 133), 202 (ref. 133), 203, 204, 206 (ref.
 133), 220
 Schering, A. G., 293, 320
 Schermerhorn, L. G., 319
 Scheuer, M., 367 (ref. 153), 438
 Scheuring, H., 30 (ref. 269), 47
 Schieblich, 246
 Schlösing, T., 336 (refs. 187, 188), 349,
 367 (ref. 189), 410, 411, 439
 Schlössmann, H., 6, 47
 Schopfer, 246

- Schmalz, F. D., 321
 Schmidt, A., 1
 Schmidt, C. L. A., 273, 279, 321
 Schmidt, E., 20 (ref. 298), 48
 Schmidt, G., 90 (ref. 126), 91 (ref. 126),
 92 (ref. 126), 93 (ref. 126), 122
 Schmidt, J. J., 415, 439
 Schmidt, P. W., 262, 267, 320
 Schmitz, H., 273, 318
 Schneegans, D., 448, 484
 Schneider, C. L., 6, 7, 12, 47
 Schneider, W. C., 215 (ref. 148), 220
 Schnellen, C. G. T. P., 484
 Schöberl, A., 240, 275, 281, 287, 293,
 320
 Schoenebeck, v., 310, 319
 Schoenheimer, R., 271, 319
 Schollenberger, C. J., 465, 485
 Schønheyder, F., 14, 44
 Schorror, G., 198, 199 (ref. 131), 291
 Schoulties, A. L., 373 (rels. 191, 192),
 439
 Schramm, G., 285, 320
 Schröder, E. F., 176 (ref. 40), 218, 277,
 323
 Schubert, M. P., 276, 315
 Schuchardt, W., 85 (ref. 127), 87 (refs.
 85, 127), 120, 122
 Schulman, J. H., 477 (ref. 51), 482
 Schuman, R. L., 485
 Schuscha, A. T., 452, 485
 Schuster, 244
 Schwartz, W., 444 (ref. 148), 445 (ref.
 148), 473, 485
 Schwarz, H. W., 484
 Schweitzer, K., 385 (refs. 32, 193), 435,
 439
 Scott, 284
 Scott, J., 474, 485
 Sease, J. W., 256, 323
 Seebeck, E., 258, 321
 Seegers, W. H., 1 (ref. 282), 16, 20-26,
 29, 32 (refs. 272, 274, 280, 281, 303),
 33 (ref. 47), 37, 41, 45, 46, 47, 48
 Segal, C. F., 269, 315
 Selsø, S., 35 (refs. 16, 27), 38 (ref. 16),
 40
 Semmler, 258, 320
 Semnova, V., 373 (ref. 198), 439
 Sen Gupta, N. N., 451, 453 (ref. 151),
 457, 463 (ref. 151), 485
 Setterstrom, C., 237, 320
 Shanberge, J. N., 35 (ref. 65), 41
 Shapiro, S. O., 459, 466, 469 (ref. 192),
 471, 473 (ref. 192), 485
 Sharp, E. A., 1 (ref. 282), 47
 Shavel, J., Jr., 236, 315
 Sherf, A. F., 453, 485
 Sherman, H. C., 87 (ref. 128), 100 (ref.
 128), 122
 Shmuk, A., 338 (ref. 197), 366, 370
 (ref. 194), 372 (ref. 194), 373 (refs.
 195, 198), 439
 Shooter, E. M., 29 (ref. 160), 44
 Sieke, F., 479, 485
 Sierp, 481
 Silhol-Bernère, M., 85 (ref. 114), 87
 (ref. 114), 106 (ref. 114), 121
 Silverman, M., 69 (ref. 54), 82, 182,
 219
 Simpson, M. I., 241, 314
 Sinclair, W. B., 365, 439
 Singer, M., 30 (ref. 103), 42
 Singer, T. P., 91 (ref. 25), 98 (ref. 25),
 119, 312
 Sinnott, E. W., 245, 318
 Sisler, F. D., 448, 462, 485
 Sizer, J. W., 93 (ref. 129), 98 (ref. 129),
 122
 Skarzynski, B., 463, 482, 485
 Skell, P. S., 147 (ref. 5), 149 (ref. 12),
 150 (ref. 12), 165
 Skinner, C. E., 231, 270, 320
 Slack, E. B., 270, 284, 321
 Slavina, G. P., 454, 455, 470, 485
 Slotin, L., 169, 172, 196 (ref. 16), 218
 Small, L. D., 321
 Smedley-Maclean, I., 176 (ref. 35), 218
 Smirnov, A. I., 337, 338, 339 (ref. 200),
 341, 343 (ref. 205), 344, 345, 349
 (ref. 205), 351 (ref. 202), 353 (ref.
 201), 355 (refs. 200, 202, 203),
 367 (ref. 202), 370 (ref. 202), 371
 (refs. 202, 203), 372 (ref. 203), 402
 (refs. 202, 203), 414, 423 (ref. 203),
 439, 440
 Smith, C. S., 34 (ref. 323), 49
 Smith, E. L., 104 (ref. 130), 122, 225,
 321
 Smith, H. P., 2, 18, 20, 22, 26, 33 (ref.
 47), 37, 41, 45, 47, 48
 Smith, T. R., 37 (ref. 1), 39
 Smith, W. K., 18 (ref. 48), 41
 Smythe, C. V., 307, 321
 Smythe, S. V., 295, 314
 Snell, C. T., 54, 82
 Snell, E. E., 62 (ref. 56), 71, 82, 249,
 316, 321
 Snell, F. D., 54, 82
 Snellman, O., 34 (refs. 159, 287), 44,
 47
 Soares, M., 191 (ref. 111), 194 (ref.
 111), 220
 Sobotka, 243
 Söhngen, N. L., 444 (refs. 158, 160),
 445-448, 449 (ref. 158), 450, 454,

- 455 (ref. 156), 458, 465, 470, 471,
473 (ref. 158), 475, 485
Sols, A., 83 (ref. 131), 84, 104 (ref. 79),
120, 122
Sonderhoff, R., 170-172, 173 (ref. 21),
174, 177, 178 (ref. 54), 217, 218
Søndergaard, E., 27 (ref. 70), 41
Soodak, M., 188 (ref. 143), 220, 221,
222
Sørensen, N. A., 193 (ref. 124), 220
Soulier, J. P., 35 (ref. 293), 47
Sowden, J. C., 129 (ref. 43), 143
Spaulding, L. B., 34, 44
Spence, D., 444 (ref. 163), 475, 476
(ref. 161), 485
Sperber, E., 278, 320
Spielman, M. A., 156 (ref. 26), 165
Spies, 284
Spiro, 2
Spring, F. S., 257, 314
Spurr, C. L., 37 (ref. 1), 39
Stacey, 252, 254
Stahl, A. F. W. v., 485
Stanier, R. Y., 235, 321, 465, 485
Stanley, W. M., 297, 298, 320
Stanley-Brown, M., 10, 35 (ref. 56),
41, 46
Starkey, R. L., 308, 321
Stavely, H. E., 162 (refs. 36, 37), 166
Stefanine, M., 12, 14, 15, 20 (ref. 251),
26 (ref. 255), 35 (ref. 65), 41, 46, 47
Steinberg, A., 15, 47
Steinberg, R. A., 225, 248, 321
Stekol, J. A., 478, 485
Stephens, H., 56, 82
Stephenson, M., 56, 82, 240, 321, 478,
485
Stern, 284
Stern, J. R., 188 (ref. 128), 190, 197
(ref. 128), 214, 220, 221, 222
Stetten, D., 241, 280, 321, 466, 477,
485
Studel, J., 262, 278, 312
Stewart, H., 477 (ref. 51), 482
Stewart, M., 37, 45
Stickland, L. H., 478, 485
Stilller, E. T., 147 (ref. 8), 165
Stoll, A., 258, 321
Stone, R. W., 444 (ref. 174), 446, 456,
457, 459, 461, 462, 465 (refs. 169,
170), 466, 474 (ref. 169), 485
Störmer, K., 454, 457 (ref. 171), 462,
485
Strawinski, R. J., 444 (ref. 174), 446
(ref. 173), 457, 459-462, 466, 467,
469 (ref. 172), 485
Street, H. E., 385, 440
Street, O. E., 426 (ref. 207), 440
Strong, L. E., 22 (ref. 62), 29 (ref. 62),
30 (ref. 61), 41
Strong, W. A., 147 (ref. 5), 149 (ref.
12), 150 (ref. 12), 165
Stryker, W. A., 476 (ref. 176), 477, 485
Studer, A., 6, 47
Sturm, L. D., 450, 451 (ref. 88), 483,
485
Subbarrow, Y., 225, 319
Subrahmanyan, V., 116, 120, 245, 315
Suchsland, E., 410, 440
Sullivan, B., 283, 284, 293, 321
Summer, J. B., 304
Sundman, I., 170, 217
Surmatis, J. D., 418 (ref. 174), 439
Suter, C. M., 313
Sunderlin, 246
Suzuki, 243
Svedberg, T., 278, 315
Svirbely, J. L., 276, 321
Swain, L., 389 (ref. 209), 440
Swain, R. E., 238, 321
Swart, D., 164 (ref. 45), 166
Sykes, E. M., 26 (ref. 291), 47
Sylvén, B., 34 (refs. 159, 287), 44, 47
Symons, J. W., 402 (ref. 210), 440
Szecsenyi-Nagy, L., 30 (ref. 292), 47
Szent-Györgyi, A. v., 175, 218, 375, 440
- T
- Taggart, J. V., 189 (ref. 100), 219
Taggart, M. S., 444 (ref. 179), 445
(refs. 177, 178, 180), 446 (ref. 180),
449 (refs. 177, 178, 180), 455, 466,
485
Tagnon, H. J., 35 (ref. 293), 47
Takamatsu, H., 87 (ref. 132), 89, 122
Takayama, Y., 270, 321
Tanko, B., 310, 321
Tannhäuser, S. J., 90 (ref. 126), 91
(ref. 126), 92 (ref. 126), 93 (ref. 126),
95 (refs. 133, 134), 100 (ref. 133),
122
Tanret, G., 261
Tapadinhas, J., 191 (refs. 109, 111),
192 (ref. 109), 194 (refs. 109, 111),
220
Tarr, H. L. A., 309, 318
Tarver, H., 273, 279, 321
Tattersfield, F., 452, 457, 462 (ref.
181), 485
Tatum, E. L., 58, 71, 82, 249
Tausson, T. A., 447 (ref. 182), 466, 485
Tausson, W. O., 444 (ref. 186), 445,
447 (refs. 183, 191), 448, 449, 453
(ref. 189), 457 (refs. 188, 189, 194),
459, 461, 462, 464, 466-474, 485, 486

- Tausz, J., 444 (ref. 195, 197), 445, 447, 455, 456, 458, 460, 461 (refs. 196, 197), 465, 469, 471, 473 (refs. 195, 196), 474, 483
- Taylor, E. M., 479, 486
- Taylor, E. S., 253, 254, 315
- Taylor, F. H. L., 10 (ref. 237), 12, 45, 46
- Taylor, H. L., 22 (ref. 62), 29 (ref. 62), 41
- Templeman, W. G., 247, 321
- Terada, 193 (ref. 119), 220
- Thayer, I. D., 255, 317
- Thaysen, A. C., 466, 467 (ref. 200), 469, 473, 486
- Theorell, H., 269, 270, 321
- Thierfelder, H., 316, 466 (ref. 201), 477, 486
- Thoi, Nguyen-van, 85 (ref. 114), 87 (ref. 114), 90 (ref. 135), 91 (ref. 3, 118b, 138a), 92 (ref. 118b), 93 (ref. 112b), 96 (refs. 115, 118, 118b), 98 (ref. 107), 99 (refs. 112b, 115, 136), 100 (refs. 112b, 118b), 101 (ref. 118a), 103 (ref. 116), 104 (refs. 113, 117, 118b), 106 (refs. 114, 137a), 107, 109, 110, 113 (ref. 112a), 114 (ref. 118b), 118, 121, 122
- Thomas, H., 170, 171, 172 (ref. 8), 174, 177, 217
- Thomas, M. D., 237, 238, 321
- Thompson, R. C., 260, 321
- Thordarson, O., 19, 47
- Thornton, H. G., 452, 453 (ref. 61), 457, 462 (ref. 61), 463, 483
- Thorpe, W. H., 477, 486
- Thumberg, 192
- Tijmstra, S., 414, 440
- Tillmann, M., 338 (ref. 71), 436
- Tishler, M., 273, 315
- Titus, E., 161 (ref. 35), 165
- Tocantins, L. M., 6, 12, 23 (ref. 295), 48
- Todrick, A., 264, 321
- Toennies, G., 241, 262, 269, 270, 272, 273, 275, 282, 286, 321
- Tolbert, N. E., 329 (ref. 33), 365 (ref. 33), 435
- Tomiyasu, Y., 182 (ref. 63), 219
- Tomkins, R. G., 454, 486
- Tono, M., 305
- Torriani, A., 124 (ref. 41), 124 (ref. 41), 143
- Tóth, J., 335 (ref. 213), 440
- Trabaud, L., 370 (ref. 185), 439
- Tracey, M. V., 303, 322
- Trankwilizkaia, H. A., 338 (ref. 214), 370 (ref. 214), 372 (ref. 214), 440
- Travis, B. L., 12 (ref. 101), 33 (ref. 119), 42, 43
- Trevar, J. W., 7 (ref. 191), 19 (ref. 191), 45
- Tropp, C., 32 (ref. 163), 33 (ref. 163), 44
- Troutman, H. D., 163 (ref. 41), 166
- Truffault, G., 450, 486
- Tsibakova, E. T., 189 (ref. 95), 219
- Tsuchiya, Y., 270, 321
- Tuft, H. S., 21, 47
- Turkevich, J., 447 (ref. 97), 457 (ref. 97), 458 (ref. 97), 461 (ref. 97), 465 (ref. 97), 471 (ref. 97), 473 (ref. 97), 484
- Tuttle, L. C., 221 (ref. 164), 222

U

- Umbreit, W. W., 59, 61, 62, 64, 65, 70, 81, 82, 161 (ref. 34), 165, 309, 317, 449, 450, 474, 486
- Urbain, V., 454, 486
- Uschold, E., 430 (ref. 242), 441
- Uzawa, S., 90 (ref. 139), 122

V

- Valyi-Nagy, T. v., 272, 312
- Vandenbelt, J. M., 20 (refs. 277, 278), 26 (ref. 278), 32 (ref. 281), 47
- Vandendriessche, L., 120
- Van de Velde, A. J. J., 453, 486
- Van Niel, C. B., 233, 319, 444 (ref. 163), 475 (ref. 163), 485
- van Santen, A. M. A., 247, 320
- Van Slyke, D. D., 30 (ref. 67), 41
- Van Veen, A. G., 243, 284, 322
- Vennesland, B., 203 (ref. 138), 204 (ref. 140), 210, 220
- Verhagen, D., 373 (ref. 215), 440
- Vernhout, J. H., 410, 440
- Verzár, F., 78, 82
- Vesselov, I. J., 448, 456 (ref. 208), 457 (ref. 194), 462 (ref. 194), 469, 486
- Vicentini, V., 279, 318
- Vickery, H. B., 327 (refs. 169, 217), 340, 366 (ref. 217), 370 (ref. 220), 371 (ref. 220), 377 (ref. 220), 385 (refs. 217-224), 395 (refs. 217-224), 405, 407 (ref. 224), 439, 440
- Vierling, K., 450, 486
- Vigier, P., 463 (ref. 210), 486
- Vigneaud, V. du, 241, 243, 247-249, 271, 272, 279, 280, 283, 293, 313, 314, 316, 319, 322, 323
- Vincke, E., 20 (ref. 298), 48
- Virtanen, A. I., 170, 217
- Vittu, C., 85 (ref. 88), 121

- Vladescu, I., 402 (refs. 225-227), 440
 Vogler, 230
 Volgunov, G. P., 338 (ref. 229), 343, 355 (refs. 228, 229), 418 (refs. 228, 229), 440
 Volk, M. E., 88 (ref. 44), 120
 Volkert, M., 1 (ref. 300), 34 (ref. 20), 35 (ref. 116), 36, 37, 38 (ref. 16), 40, 48
 Vriens, J. G. C., 414, 440
- W
- Wackenhut, A. M., 451, 457, 473 (ref. 214), 486
 Waelsch, H., 263, 272, 273, 322
 Wagner, A., 320
 Wagner, J., 86 (ref. 84), 120
 Wagner, R., 444 (ref. 215), 445, 447 (ref. 215), 453 (ref. 215), 461, 465, 471, 486
 Wagner-Jauregg, T., 261, 276, 322
 Wakelin, R. W., 319
 Wakeman, A. J., 385 (refs. 222-224), 395 (refs. 222-224), 407 (ref. 224), 440
 Waksman, S. A., 146, 164, 165, 166
 Walbum, L. E., 452 (ref. 216), 453, 486
 Waldschmidt-Leitz, E., 84 (refs. 148, 149), 87 (refs. 140, 141), 95 (ref. 142), 122
 Walker, E., 264, 321
 Walker, F., 87 (ref. 128), 100 (ref. 128), 122
 Walker, N., 56, 74, 81
 Walking, A. A., 23 (ref. 212), 27 (ref. 212), 45
 Wall, M. E., 372 (ref. 231), 440
 Walpole, G. S., 9, 41
 Walsch, G., 98 (ref. 143), 122
 Walsch, O. F., 98 (ref. 143), 122
 Walti, A., 147 (refs. 6, 7), 149 (ref. 11), 165
 Walz, D. E., 154 (ref. 19), 165
 Warburg, O., 98, 104 (ref. 144), 118, 122, 276, 290, 295, 322
 Ward, G. M., 327 (ref. 232), 363, 402 (ref. 232), 440
 Ward, J. L., 319
 Ward, W. H., 367 (ref. 93), 368 (ref. 93), 437
 Ware, A. G., 16, 20 (refs. 301, 307), 21, 22 (refs. 302, 307), 23 (ref. 307), 24, 25 (refs. 214, 304), 26 (refs. 214, 291, 304, 306), 27 (ref. 83), 29, 32 (ref. 303), 42, 45, 46, 47, 48
 Warner, E. D., 2, 26 (ref. 308), 33 (ref. 47), 41, 47, 48
 Warner, R. C., 313
 Waters, E. T., 34 (ref. 158), 44
 Watson, E. M., 95 (ref. 146), 122
 Watson, J., 327 (ref. 5), 353 (ref. 5), 399 (refs. 4, 5), 402 (refs. 4, 5), 434
 Webb, R. A., 240, 313
 Weber, K., 431, 440
 Webster, 260
 Weeks, M. E., 372, 435
 Weidenhagen, R., 278, 322
 Weidinger, A., 283, 322
 Weil, L., 93 (ref. 68), 120, 392, 440
 Weindling, 257
 Weinhouse, S., 172, 176 (ref. 45), 177, 182, 184 (ref. 69), 187, 188 (refs. 45, 87), 218, 219
 Weirich, C. L., 444 (ref. 37), 474 (ref. 37), 482
 Weisblat, D. I., 34 (ref. 325), 49
 Weisz-Tabori, E., 202, 203 (ref. 136), 204 (ref. 136), 206 (ref. 136), 220
 Weitnauer, H., 31 (ref. 309), 48
 Weller, 291, 312
 Wender, S. H., 373 (refs. 87a, 191, 192, 215), 436, 439, 440
 Wendt, G., 243, 322
 Wenusch, A., 407 (ref. 237), 434 (refs. 235-237), 440
 Werkman, C. H., 169, 172, 182, 196 (ref. 15), 218, 219
 Werle, E., 407 (ref. 238), 430, 440, 441
 Werner, B., 34 (ref. 161), 44
 Werner, H., 99 (ref. 19), 119
 Wernham, C. C., 453 (ref. 217), 486
 West, P. M., 249, 322
 West, R., 7, 9 (ref. 58), 41
 Westphal, 243
 Weston, W. H., 453, 482
 White, A. G. C., 446 (refs. 169, 170), 456 (ref. 170), 459 (ref. 169), 465 (refs. 169, 170), 466 (ref. 170), 474 (ref. 169), 485
 Whitney, M., 336, 441
 Wiame, J. M., 34 (ref. 310), 48, 123 (ref. 13), 142
 Widenbauer, F., 4, 9, 48
 Widmann, K., 6 (ref. 75), 41
 Wieland, H., 170, 172 (ref. 12), 173, 176 (ref. 36), 177-179, 182, 183, 184 (refs. 12, 67), 188 (ref. 67), 217, 218, 219, 295, 296, 322
 Wiemer, K., 27, 48
 Wieringa, K. T., 235, 322
 Wight, K. M., 308, 321
 Wiken, T., 454, 486
 Wilander, O., 34 (ref. 315), 48

- Wildman, S. G., 374, 434, 441
 Wille, F., 176 (ref. 36), 218
 Williams, 243
 Williams, H. L., 95 (ref. 146), 122
 Williams, R. J., 316
 Willits, C. O., 376 (refs. 157, 245), 438
 441
 Willstätter, R., 78, 82, 84 (refs. 147-
 149), 122
 Wilson, D., 177, 183, 184 (ref. 51), 185
 (ref. 74), 188 (ref. 88), 218, 219
 Wilson, P. W., 249, 322
 Wilson, S. H., 322
 Wilson, S. J., 19 (ref. 317), 37, 48
 Windisch, S., 173 (ref. 25), 218, 432,
 435
 Windus, 273
 Winogradsky, H., 304, 322
 Winogradsky, S., 304, 322
 Winter, A. O., 238, 322
 Winterfeld, K., 296, 322
 Winternitz, M. C., 35 (ref. 215), 45
 Wintersteiner, O., 147 (ref. 4), 154
 (ref. 19), 160 (ref. 32), 165
 Wise, E. C., 23 (ref. 66), 41
 Witkop, B., 295, 322
 Witts, L. J., 20 (ref. 318), 48
 Wöhlich, E., 2, 3, 6, 8, 23 (ref. 321),
 29, 30, 31 (ref. 309), 32, 33 (ref.
 163), 38, 44, 48
 Wolf, D. E., 68, 82, 248, 316
 Wolf, F. A., 332 (ref. 45), 334 (ref. 45),
 353 (refs. 39, 40, 45), 354 (ref. 45),
 355 (ref. 45), 399 (refs. 39, 40, 45),
 400 (ref. 45), 401, 402 (refs. 39, 40,
 45), 403-408, 422, 423, 425, 435
 Wolfrom, M. L., 34, 49, 145 (ref. 1),
 151 (ref. 14), 154 (ref. 21), 155, 158
 (ref. 29), 159, 160 (ref. 30), 161 (ref.
 33), 164, 165
 Wolochow, H., 123 (ref. 13), 139 (ref.
 46), 142, 143
 Wood, H. G., 169, 172, 196 (ref. 15), 218
 Wood, J. L., 283, 323
 Wood, W. A., 59, 61, 64, 65, 82
 Woodruff, H. B., 146, 164
 Woods, D. D., 52, 53, 55, 75, 82
 Woodward, C. F., 389 (ref. 209), 392,
 436, 440, 441
 Woodward, G. E., 277, 323
 Wookey, E., 307, 314
 Wooldridge, W. R., 174, 218
 Woolley, D. W., 234, 323
 Work, 254
 Wormald, A., 385 (ref. 163), 438
 Wunderly, C., 29, 49
 Wynne, A. M., 85 (ref. 91), 100 (ref.
 91), 105 (ref. 91), 113 (ref. 91), 121
- Y
- Yantzi, M. F., 458 (ref. 68), 466 (ref.
 68), 467 (ref. 68), 470 (ref. 68), 483
 Young, J. W., 308, 323
 Young, P. A., 454, 486
 Yurovskii, A. Z., 454, 486
- Z
- Zahn, H., 286, 323
 Zak, 2
 Zaporozhanu, I., 327 (refs. 247, 248),
 343, 349, 350, 353 (ref. 248), 402 (refs.
 227, 247, 248), 440, 441
 Zechmeister, L., 256, 323
 Zeile, 277
 Zfasman, E. M., 123 (ref. 31), 141 (ref.
 31), 142
 Ziegler, E., 299, 323
 Ziff, M., 5, 33 (ref. 59), 34 (ref. 60), 41
 Ziffren, S. E., 26 (ref. 308), 48
 Zimmerman, P. W., 237, 320
 ZoBell, C. E., 444 (refs. 226, 227, 232),
 445, 446 (ref. 234), 447 (refs. 226,
 232, 234), 448, 451, 453 (ref. 234),
 455 (ref. 235), 457, 458 (ref. 234),
 459, 460, 461 (refs. 223, 235), 462,
 463 (ref. 235), 464, 469, 470, 471
 (ref. 235), 472 (ref. 225), 473, 474
 (ref. 226), 475 (refs. 232, 233), 476,
 478 (ref. 231), 479, 483, 484, 485,
 486
 Zondek, B., 6, 27 (ref. 104), 42
 Zuidema, H. H., 468 (ref. 236), 486
 Zunz, E., 27, 49

SUBJECT INDEX

A

- Accelerator factor. See *Factor 5*.
 Accelerator globulin. See *Factor 5*.
 Accelerin and blood clotting, 28
 Acetaldehyde, dehydrogenation by yeast, 190
 Acetate. See also *Acetic Acid*.
 decomposition in yeast, 169-176
 Acetic acid. See also *Acetate*, *Citric acid cycle*, and *2C-particles*.
 activated, 221-222
 "activation" in citric acid cycle, 177-180, 180-182, 184-186, 188-190
 degradation in the animal body, 176-177
 Acetoacetic acid, biosynthesis, 221-222
 formation by oxidation of fatty acids, 187-188
 transformation into citric acid by muscles, 182-186
 Acetylphosphate in citric acid cycle, 189-190, 221-222
 Acid phosphatase. See *Phosphatase*.
 Aconitase, in citric acid cycle, 169, 190-199
 kinetics of action, 192-196
cis-Aconitic acid. See also *Citric acid cycle*.
 in citric acid metabolism, 169, 194-196, 196-199
 Activation, heat of, in tryptophan→ indole reaction, 66-68
 of acetic acid, 177-182, 184-186, 188-190, 221-222
 of alkaline phosphatase, by amino acids, 101, 106-107
 by divalent cations, 89-93, 98-100, 102-104, 110-111
 of blood coagulation, 3-28
 of enzymes by amino acids, 100, 103-104, 106-107, 278
 of trypsinogen, 12
 Adaptation, of enzymes attacking hydrocarbons, 449, 464
 of sucrose phosphorylase, 124-125
 of tryptophanase, 56, 75-81
 Adenosinetriphosphate, 300
 Adenosine triphosphate, energy supply for glycoside bond formation, 128
 in citric acid cycle, 189-190, 214, 221-222
 Adenylpyrophosphatase, role of metal ions, 104
 specificity, 86
 Adenyl-D-thiomethylribose from yeast, 243
 Agar-Agar. See *Polysaccharide sulfuric acid esters*.
 Aging of tobacco. See also *Tobacco leaf*.
 chemical changes in, 401-409
 technique, 400
 types of processing, 327-333
 Alanine, activation of alkaline phosphatase by, 106-107
 effect on indole production from tryptophan, 58-60, 62, 77
 reactivation of alkaline phosphatase by, 111
 Alcohol(s), ethyl, dehydrogenation by yeast, 190
 from microbial oxidation of hydrocarbons, 467-469
 Aldehydes, from microbial oxidation of hydrocarbons, 467
 Algae, sulfuric acid esters in, 227, 234-235
 Alkaline phosphatase. See *Phosphatase, alkaline*.
 Alkaloids. See also individual alkaloids, e.g., *Nicotine, Normicotine*.
 degradation in processing of tobacco, 429-433
 fate in fermenting tobacco, 386-394, 428
 methods for determination, 388-389
 Allicin. See *Diallyldisulfoxide*.
 Alliinase in plants, 258
 Aluminum-enzyme complex formation, 201-202, 207-208
 Amanitin in plants, 285, 296
 Amberlite, use in decalcification of plasma, 15
 D-Amino acid oxidase in plants, 300

- Amino acids.** See also under individual amino acids.
 changes during fermentation of tobacco, 340, 382-386, 396, 403, 429
 complex formation with quinones, 381, 382-386, 408, 429
 reaction with sugars in aging of tobacco, 408
 relation to cystein inhibition of *Aspergillus niger*, 225
 role in activation of enzymes, 100, 103-104, 106-107
- Amino groups,** relation to activity of alkaline phosphatase, 97-98, 101
- Ammonia.** See also *Nitrogen compounds.*
 in tryptophan metabolism, 61-62, 63-64, 68
 loss from tobacco during fermentation, 340, 350, 377
 sources in tobacco fermentation, 395-398
- Amylase,** activation by amino acids, 100
- Amylomaltase,** in utilization of maltose by *E. coli*, 124
 reversibility of action, 141
- Amylosucrase** in synthesis of sucrose to polysaccharide, 141
- Anaphylactic shock,** antithrombin in, 36
- Aneurin.** See *Thiamine.*
- Antagonism,** among factors affecting alkaline phosphatase, 102-104
 of nicotinic acid to benzamide, 69
 of riboflavin to mepacrine, 69
- Anthranilic acid,** in tryptophan synthesis, 71
- Antibiotic activity of streptomycin,** relation to structure, 160-161
- Antibiotic compounds,** from *Streptomyces*, 145-166
 in plants, 267-268
- Anticoagulants,** 12, 15-17, 33-38
 synthetic, 34-35
- Antigens,** effect on antithrombin, 36-37
- Antiinhibition of enzyme activity,** 99, 102-104
- Antiseptic action of hydrocarbons,** 451-452, 452-453
- Antithrombin and blood clotting,** 12-13, 19, 33-38
- Antithromboplastic agent in hemophilic blood,** 12
- Arginase,** 300
 reactivation, 111
 relation to structure of alkaline phosphatase, 116-117
- Arsenate,** replacement of phosphate in presence of phosphorylase, 127, 140
- Ascorbic acid** in plants, relation to thiamin, 247
- Aspartic acid** in plant metabolism, 258
- Atabrine.** See *Mepacrine.*
- ATP.** See *Adenosine triphosphate.*
- Aureomycin,** activity, 164
 structure, 164
- Autocatalysis of blood clotting,** 7-13, 25-28
- Autoxidation,** in fermenting tobacco, 345-349, 373-375, 382-386, 417
 of glutathione, 294-295

B

- BAL.** See *2,3-Dimercaptopropanol.*
- Barium ions,** promotion of citric acid formation, 215
- Benzene,** biological oxidation to polyphenols, 469
- Benzyl mustard oil,** occurrence and properties, 265
- Bicarbonate ion,** influence on citric acid synthesis, 215
- Biotins,** in plant metabolism, 227, 247-250
 relation to cysteine in plants, 269
- Blood clotting,** 1-49
- Blood platelets.** See *Platelets.*
- Bradykinin** in blood, 39
- Bromelin,** 300
- Buffering system of tobacco,** 352-354
- Burning properties of tobacco,** 356-357
- sec-Butyl mustard oil,** optically active, 264

C

- Calcium ions,** activation of alkaline phosphatase by, 99, 102-104, 110
 and blood clotting, 2, 10, 11, 12, 13-15, 20, 24, 25, 26
 binding to proteins, 14
 effect on activation of trypsinogen, 12
 effect on tryptophanase action, 71
 in citric acid cycle, 201, 215
- Carbohydrate(s).** See also under individual carbohydrates.
 changes during fermentation of tobacco, 340, 363-364, 396, 397, 401-406
 fermentable, inhibition of indole production by bacteria, 74-81
 in plant metabolism, 224-225

- Carbon dioxide, fixation on α -ketoglutaric acid, 208-213
 production in microbial attack on hydrocarbons, 447-448, 465-466
- 2C-particles. See also *Acetaldehyde* and *Acetic acid*.
 activation, 180-182
 in citric acid cycle, 188-190
- Carboxylase, complex formation, 204-208
 in plants, 300
 relation to structure of alkaline phosphatase, 116-117
 oxalosuccinic acid in citric acid cycle, 202-208, 209-213
 reactivation, 111
- Carboxylation of α -ketoglutaric acid to oxalosuccinic acid, 208-213
- Carboxypeptidase, decomposition of glutathione by, 295
- Carotene in tobacco, 372
- Carotenoid pigments from microbial action on hydrocarbons, 470, 479
- Carriers. See also *Oxygen transferring agents*.
 in plant tissues, 374-375
- Catalase in tobacco, changes during processing, 414, 415, 421, 423
- Catechol oxidase in tobacco fermentation, 383
- Cations, divalent, interchangeability for alkaline phosphatase action, 113-114
- Cellulose, changes during fermentation of tobacco, 369-370, 396, 402
 oxidized, action on thrombin, 23
- Cellulosesulfuric acid, effect on blood clotting, 35
- Cephalin and blood clotting, 4
- Cerium, effect on tryptophan metabolism, 68
- Choirolin (γ -thiocarbimidopropylmethylsulfone), occurrence and properties, 264-265
- Chitindisulfuric acid, effect on blood clotting, 35
- Chloramine-T, action on fibrinogen, 33
- Chloramphenicol. See *Chloromycetin*.
- Chloroform, action in blood clotting, 12-13
- Chloromycetin, activity, 162-163
 structure, 163
- Chlorophyll, changes during fermentation of tobacco, 340
 sulfur in formation of, 224
- Choline, acetylation, 221
- Choline sulfuric acid ester in algae, 234
- Chondrosulfatase in plants, 310-311
- Chromium, effect on tryptophan metabolism, 68
- Cigar leaf tobacco, sweat processes for, 358-399
- Cigarette tobacco, aging, 399-409
- Citric acid, asymmetric degradation, 196-199
 changes during fermentation of tobacco, 340, 364-366, 396, 402
 degradation in yeast, 173-176
 equilibrium with isocitric acid and *cis*-aconitic acid, 194-196
 influence of ions on formation of, 214-216
 transformation into isocitric acid, 193-194
 into α -ketoglutaric acid, 167-168
- Citric acid cycle, 167-222. See also *Tricarboyllic acid cycle*.
 enzymes effective in, 213-217
 mechanisms of condensation reactions, 177-190
 scheme, 198
- Clarase, inhibition of penicillin, 253
- Clotting, blood, 1-49
- Clotting time, and thromboplastin, 4-5, 9-10
 effect of ion concentration, 30-32
 use of silicone technique, 15-17
- Coactivation with respect to alkaline phosphatase, 102-104
- Coagulation of blood, 1-49
 activation, 3-28
 inhibition, 33-38
- Cobalt ions, activation of alkaline phosphatase by, 99, 110
 effect on penicillin action, 254
 on tryptophan metabolism, 68-69
- Coccarboxylase in plants, 227
- Codehydrogenase, in the carboxylation of α -ketoglutaric acid, 208-213
- Coenzyme A, in citric acid cycle, 190, 221-222
- Coenzyme I. See *Diphosphopyridine nucleotide*.
- Coenzyme factors for tryptophanase, 60-62
- Combustion, heat of, changes during tobacco fermentation, 337-342
- Complex formation, and inhibition of alkaline phosphatase, 94-97
 in enzyme action, 73-74, 96-97, 102-104, 111, 113-117, 201-202, 204-208
- Copper ions, effect on tryptophan metabolism, 68-69, 71
 in citric acid cycle, 201

- Crotonyl mustard oil, occurrence and properties, 264
- Curing of tobacco, flue, 327, 353, 399-409, 427
 processes used, 326-327
 shed, 326-327, 353, 372, 426-427
- Cystathionine in plant metabolism, 268-284
- L-Cystathionine in the synthesis of methionine, 274-275
- Cysteine, activator of plant enzymes, 278
 and blood clotting, 23
 complexes with heavy metals, 276
 inhibition of bacteriostatic action of penicillin by, 254
 in plant metabolism, 225, 226, 268-284
 reaction with glucose at room temperature, 276-277
- L-Cysteine, occurrence and action, 307
- Cysteine desulfurase, 307
- Cysteine acid, 282
- L-Cysteine monohydrochloride in plant metabolism, 281
- L-Cysteinesuccinic acid, formation, 277
- Cysteinesulfonic acid, 282
- Cystine, in plant metabolism, 225, 268-284
 in plants (tables), 282-284
- Cystinase, occurrence and action, 307
- Cytochrome, methionine content, 270
 effect on tryptophanase activity, 61
- Cytochrome oxidase, effect on cysteine, 278
- ### D
- Deamination of amino acids by quinone-amino acid complex, 382-386, 429
- Decalcification of plasma, by ion exchanging resins, 15
 by metaphosphates, 15
 by pyrophosphates, 15
- Decarboxylase(s), amino acid, pyridoxal phosphate as coenzyme for, 62, 70
 tyrosine, 62-63, 65
 reactivation, 111
- Decarboxylations, in fermenting tobacco, 349, 365-366
- Dehydroascorbic acid, complex formation with glutathione, 295
- Dehydrogenase, alcohol, in plants, 300
 choline, in plants, 300
 in microbial action of hydrocarbons, 448
 isocitric, 215, 216-217
 in carboxylation of α -ketoglutaric acid, 208, 212-213
 pyrroacemic acid, 180-181
 pyruvic, action of arsenic oxide on, 216
 succinic, in plants, 300, 309
 selective inhibition, 174-175
- Dehydrogenation, microbial, of hydrocarbons, 469
- Dermatitis from products of microbial action on hydrocarbons, 474
- Desmoenzyme, in conversion of pyrroacemic acid to citric acid, 213
- Desthiobiotin in plant metabolism, 249
- Desulfurase in the liver of higher animals, 308
- Detoxication, of aromatic hydrocarbons, 477-478
 of nicotine, 429
- Dextran, enzymic synthesis from sucrose, 141
- Diallyl sulfide in plants, 242
- Diallyl disulfoxide, synthesis in plants, 258
- Diaxase in tobacco, 423
- Dicoumarol, and blood clotting, 24, 27
 and prothrombin concentration, 19-20
- Dihydrostreptomycin, activity against *Mycobacterium tuberculosis*, 160
- 2,3-Dimercaptopropanol (BAL), effect on blood clotting, 23
- Dimethyl disulfide in mushrooms, 240, 257
- Diphosphopyridine nucleotide in tryptophanase action, 61-62
- Disaccharides, enzyme synthesis, 123-143
- Dismutation between α -ketoglutaric and oxalic acids, 190
- Dissociation, reversible, of alkaline phosphatase, 108-110
 of enzyme system, 117
- Disulfide bridges in proteins, 278, 286-288
- Disulfides, nonnitrogenous alicyclic, in plant metabolism, 257-259
- Dithiols, synthetic, 300-301
- Divalent cations, interchangeability for alkaline phosphatase action, 113-114
- Djenkolic acid in plants, 243

E

- Energy source for synthesis of di- and polysaccharides, 128-129, 141
- Enzyme complex formation, 73-74, 95-97, 102-104, 111, 113-117, 201-202, 204-208
- Enzyme inhibitors. See *Inhibitors*.
- Equilibrium constant for sucrose synthesis, 128
- Ergothioneine, occurrence in plants, 261-262
- Erysoline (δ -thiocarbimidoethylmethylsulfone), occurrence, 265
- Escherichia coli*, mechanism of utilization of maltose, 124, 141
- tryptophan metabolism, 51-82
- Essential oils, changes during fermentation of tobacco, 370-372
- Esterases, for decomposition of aromatic hydrocarbons, 463
- vegetable, relation of pH to activity, 84
- Ethyl alcohol, dehydrogenation by yeast, 190
- Exchange of glycoside linkages in synthesis of di- and polysaccharides, 124, 138-141

F

- Factor 5 and blood clotting, 3, 9, 10, 11, 13, 19, 20, 23-28
- Factor 6 and blood clotting, 24-28
- Fatty acids, degradation, 189-190
- oxidation, 186-188
- relation to citric acid cycle, 213-214
- Fermentation, of tobacco, aging of cigarette tobacco, 399-409
- causative agents, 409-433
- changes during sweating, 361-399
- changes in water retention, 354-355
- changes of pH, 352-354
- enzymic theory, 412-415, 415-425
- gas exchange during, 342-352
- improvement of burn, 356-357
- loss of weight, 335-336, 361-363
- of tobacco leaf, 325-441
- qualitative changes, 333-335
- temperature increase, 336-342
- types of processing, 327-333
- sweat techniques, 358-361
- relation to tryptophanase activity, 78-81
- Ferric ions. See also *Ferrous ions* and *Iron*.
- in citric acid cycle, 201

- Ferrous ions, activation of alkaline phosphatase by, 99, 102-104
- Fibrin, autocatalytic formation, 8
- Fibrinogen. See also *Clotting, blood*.
- action of various enzymes on, 12-13, 33
- clotting, 30-33
- properties, 29-30
- Fibrinolysin, 12, 22, 32
- Ficin, 300
- Fission, enzymic, mechanism, 62-64
- Flavonols in tobacco, 347-349, 373-375
- p*-Fluorobenzylpenicillin, 255
- Formic dehydrase in plants, 309
- Free radicals, and mechanism of tryptophanase action, 62-64, 69
- Fructose, use in synthesis of sucrose, 123-132, 138-141
- β -Fructosidase. See *Invertase*.
- Fumarate, effect of streptomycin on oxidation, 161
- Fumaric acid. See also *Citric acid cycle*.
- in plant metabolism, 258
- in yeast metabolism, 174-176
- Fungicidal action of sulfur, 238
- Furanose-pyranose, equilibrium mixture of D-fructose, 132

G

- Gas exchange in microbial attack on hydrocarbons, 446-448, 465-466
- Germicidal action of hydrocarbons, 451-454
- Germination-promoting properties of thiosinamine, 260-261
- Gliotoxin in plant metabolism, 257
- Globulin, nature of thromboplastin, 9-10
- Glucocheiroline, occurrence, 266
- Glucosylerysoline, occurrence, 266-267
- Glucosasturtiin, occurrence, 266
- 3[α -D-Glucopyranosyl]-L-arabinopyranose, synthesis by sucrose phosphorylase, 129-131, 136-138, 138-141
- α -D-Glucopyranosyl- α -L-araboketofuranoside. See *D-Glucosyl-L-araboketoside*.
- α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranoside, synthesis by sucrose phosphorylase, 129-131, 132-134, 138-141
- α -D-Glucopyranosyl- β -D-xyloketofuranoside, synthesis by sucrose phosphorylase, 129-131, 134-135, 138-141

- Glucose, inhibition of tryptophanase, 69, 74-81
 reaction with cysteine, 276-277
- Glucose acceptors, in di- and polysaccharide synthesis, 138-141
- Glucose donors, for sucrose phosphorylase, 138-140
 in di- and polysaccharide synthesis, 138-141
- Glucose phosphates in citric acid cycle, 211-212
- Glucose-1-phosphate, enzymic hydrolysis, 89
 use in synthesis of sucrose, 123-143
- "Glucose transferring agent" in di- and polysaccharide synthesis, 138-141
- Glucosulfatase, in plants, 311
 relation of pH to activity, 84
- Glucotropaolin, occurrence, 266
- D-Glucosyl-L-araboketoside, synthesis by sucrose phosphorylase, 129-131, 135, 138-141
- Glutamic acid in relation to penicillin, 253-254
- Glutathione, 229-231
 autooxidation, 294-295
 complex formation with dehydroascorbic acid, 295
 effect on blood clotting, 23
 in conversion of disulfides to mercaptans, 240
 in plant metabolism, 225, 226, 284, 288-295
 in redox systems in plants, 289-295
- Gluten proteins, 299-300
- α -Glycerophosphatase from yeast, 87
- Glycolysis, relation to tryptophanase action, 78-81
- Glycoside linkage exchange in synthesis of di- and polysaccharides, 124, 138-141
- H**
- Halogen compounds, organic, poisonous effect, 277-278
- Hemicelluloses, changes during fermentation, 366-368, 402
- Hemophilia, and factor 5, 25, 28
 in experimental animals, 17
 prothrombin conversion rates, 16-17
 thromboplastic activity in, 6, 7, 9, 10-13
- Heparin and blood clotting, 5, 33-38
- Heparinase, 34
- Hexodiphosphatase from the kidney and liver of mammals, 87
- Histochemistry in the detection of alkaline phosphatase in animal tissues, 89
- Hyaluronic acid, monosulfuric acid ester, 236
- Hydrocarbons, assimilation by animals, 476-478
 assimilation by microorganisms, 443-486
 bacterial dehydrogenation, 469
 criteria used for microbial attack on, 445-448, 465
 derivatives, action of microorganisms on, 462-464
 germicidal action, 451-454
 oxidizability by microorganisms, 454-462, 467-469
 polycyclic, microbial oxidizability, 461-462
 production by microorganisms, 478-479
 by plants, 478
 products of microbial oxidation, 444-445, 464-470
 susceptibility to attack by microorganisms, 456-462
 difference between paraffinic and cyclic compounds, 456-457
 variation with branching, 460-461
 with chain length, 449, 454-456, 457-459
 with degree of unsaturation, 459-460
 variety attacked, 444-445
- Hydrocarbon-oxidizing organisms, action, 454-456, 456-462
 distribution, 449-451
- Hydrogenase, relation to sulfur metabolism, 308-310
- Hydrogen bond in enzyme-substrate complex, 73-74
- Hydrogen sulfide, formation in nature, 231-232
 from microbial action on hydrocarbons, 448, 473
 in plant metabolism, 232-234
- Hydrolase systems, in relation to redox potential, 289
- p-Hydroxy-benzyl mustard oil, occurrence and properties, 265
- Hydroxyl groups, relation to activity of alkaline phosphatase, 97-98
- Hydroxyphenols. *See Oxyphenols.*
- Hyperprothrombinemia in pregnancy, 19
- I**
- Inactivation, of acid phosphatase, 90

- Inactivation** (*continued*)
 of alkaline phosphatase, by destruction or blocking of amino or thiol groups, 97-98
 by formation of complexes, 94-97
 of prothrombin, 22-23
- Indole**, determination, 54
 mechanism of formation, 53-60, 62-64
 precursors, 52
 production from tryptophan, 51-82
 utilization by bacteria, 71-74
- β -Indoleacetic acid in plants, 247
- Indophenol oxidase** in tobacco leaves, 421
- Induction period** in citric acid cycle, 178-179
- Inhibition**, of alkaline phosphatase, 91-98
 of citric acid, 215-216
 of coagulation of blood, 33-38
 of enzymes, and reactivation, 102-104
 by complex formation, 95-97
 of fumarate oxidation by streptomycin, 161
 of oxidation by nicotine, 388
 of penicillin, 253, 254
 of succinic dehydrogenase, 174-175
 of tryptophanase, 69, 70-71, 74-81
- Inhibitors**, enzyme, and resonance structures, 72-74
 in hydrocarbons, 471
 of acid phosphatase, 90
 of aconitase, 192
 of indole formation, 53-54, 58-60, 69-71, 71-74, 74-81
- Intestinal bacteria**, action on hydrocarbons, 476, 479
- Invertase**, and sucrose synthesis, 126-127
 in *Pseudomonas saccharophila*, 125
 See also *Sucrase*
- Ion-exchange resins** in blood-clotting study, 15, 20
- Iron**. See also *Ferric ions*, and *Ferrous ions*.
 in tryptophanase, 61
- Iron salts**, effect on tryptophan metabolism, 68, 71
- Irradiation**, effect on blood coagulability, 37
- Isobutylpropenyl disulfide**, isolation, 259
- Isocitric acid**. See also *Citric acid cycle*.
 equilibrium with *cis*-aconitic and citric acids, 194-196
- Isocitric acid** (*continued*)
 formation from citric acid, 193-194
 in tissues, 169
 relation to oxalosuccinic acid metabolism, 206
 stereoisomeric forms, 192-193
- J**
- Jaundice**, obstructive, antithrombin in, 36
- K**
- α -Keto acids in fermenting tobacco, 349, 383-386
- β -Keto acids in citric acid cycle, 182-6
- α -Ketoglutaric acid. See also *Citric acid cycle*.
 carboxylation to oxalosuccinic acid, 208-213
 from citric acid, 167-168
 in dismutation, 190
- Ketones** from microbial oxidation of hydrocarbons, 467
- Kynurenine** from tryptophan, 56
- L**
- Labile factor**. See *Factor 5*.
- Lactic acid** in relation to growth of lower plants, 225
- Lecithin**, and blood clotting, 27
 in snake venoms, 19-20
- Leuconostoc mesenteroides*, source of sucrose phosphorylase, 123, 141
- Leucylpeptidases**, reactivation of, 111
- Leukemia**, antithrombin in, 37
- Levan**, enzymic synthesis, 141
- Lignin**, changes during fermentation of tobacco, 369-370, 396, 402
- Lipase**, pancreatic, activation by amino acids, 100
 relation of pH to activity, 84
- M**
- Magnesium ions**, effect on alkaline phosphatase, 89-93, 98-100, 102-104, 106-107, 110-111, 113
 in citric acid cycle, 189, 201, 208, 215
- Malic acid**, changes during fermentation of tobacco, 340, 364-366, 396, 402
- Malonate**, inhibition of degradation of acetic acid in yeast, 174-176
 inhibition of tissue respiration, 168

- Maltol rearrangement of streptomycin, 156-157
- Maltose, enzymic synthesis, 141
mechanism of utilization by *Escherichia coli*, 124
- Manganese ions, complex formation, 201-202, 204-208
activation of alkaline phosphatase by, 99-100, 102-104, 110-111
effect on tryptophan metabolism, 68
in carboxylation of α -ketoglutaric acid, 208-209, 213
- Mannosidostreptomycin, structure, 161-162
- Melanoids formed in aging of tobacco, 408
- Melibiase, action on raffinose, 125
- Mepacrine, effect on tryptophan metabolism, 59-60, 64, 69
- Mercaptans in plant metabolism, 257
- Mercuric ions, effect on alkaline phosphatase, 99
- Mercury ions, effect on tryptophanase action, 71
- Metal complexes, chelated, and tryptophan metabolism, 64
- Metal-enzyme complex, 102-104, 111, 113-117, 204-208
- Metal ions. See also under individual ions.
and enzyme-inhibitor complex, 96-97
catalysis of indole production, 68-69
effect on autooxidation of glutathione, 294-295
inhibition of tryptophanase action, 70-71
- Metaphosphatase, pH optimum, 84
- Metathrombin, 38
- Methane. See also *Hydrocarbons*.
attack by microorganisms, 444-445, 446-447, 449, 454-455, 458
production by microorganisms, 478-479
- Methionine, and bacterial growth, 274
content of plant proteins (table), 271
in plant metabolism, 268-284
synthesis in living plant cells, 271-274
- Methionol. See γ -[Methylmercapto]-propyl alcohol.
- Methylation of inorganic sulfur in plants, 240
- Methylene blue reduction in microbial attack on hydrocarbons, 447, 469
- N-Methyl-L-glucosamine, 147-149, 157-158, 160, 162
- Methyl mercaptan, formation in mushrooms, 240-241
- γ -[Methylmercapto]-propyl alcohol, 242
- β -Methylthiopropionic acid, methyl ester, in plants, 242-243
- Microorganisms, action of hydrocarbons on, 451-454
action on hydrocarbons, 443-486
criteria used in determining activity, 445-448
factors favoring, 448-449, 470
oxidation, 454-462
products, 464-470
variety attacking hydrocarbons, 445, 449-451
action on hydrocarbon derivatives, 462-464
decomposition of rubber hydrocarbons, 474-476
modification of petroleum and its products, 470-474
- Mustard oil glucosides, formation, 265-266
- Mustard oils in plant, 262-268
- Myrosulfatase in plants, 310

N

- α -Naphthoquinone sulfonate, action on fibrinogen, 33
- Neomycin, activity, 164
- Neurospora crassa*, tryptophan metabolism, 58-60, 62
- Nickel, Raney, effect on tryptophan metabolism, 68
- Nickel ions, activation of alkaline phosphatase by, 99, 110
- Nicotine. See also *Alkaloids*.
changes during fermentation of tobacco, 340, 386-394, 403
degradation in processing of tobacco, 429-433
detoxication in the animal body, 429
effect of catalase on disappearance from tobacco, 414
- Nicotinic acid, antagonism to benzamide, 69
in tryptophanase, 61-62
relation to thiamine in plants, 246, 247
- Nicotyrine, oxidation by liver, 430
- Ninhydrin, action on fibrinogen, 5, 33
- Nitrates. See also *Nitrogen compounds*.
changes during fermentation of tobacco, 394-395, 402
in plant metabolism, 224-225
reduction in microbial attack on hydrocarbons, 448

- Nitrogen, elementary, evolution in aging of cigarette tobacco, 407-408
- Nitrogen balance during fermentation of tobacco, 340, 350, 377-380, 381-382, 386, 393-394
- Nitrogen compounds in tobacco, changes during fermentation, 376-398, 402-403, 406-409
- Nitrogen mustard, effect on blood coagulability, 37
- Nornicotine, changes during fermentation of tobacco, 389-391
- 5-Nucleotidase, activity, 87
- O
- Obstructive jaundice, antithrombin in, 36
- Ochoa reaction, 199-213
- Octylamine, precipitation of heparin, 38
- Oil, crude, extent of change by microbial action, 472-473
rate of oxidation by microorganisms, 471-472
release from oil-bearing sediments, 473
- Organic acids. See also under individual acids.
changes during fermentation of tobacco, 340, 364-366, 396, 402, 403
from microbial oxidation of hydrocarbons, 444, 466-467
- Oxalacetate-pyruvate condensation, effect of streptomycin on, 161
- Oxalacetic acid. See also *Citric acid cycle*.
in citric acid cycle, 221-222
transformation into citric acid by muscles, 180-182
- Oxalic acid, changes during fermentation of tobacco, 366, 396, 402
in dismutation, 190
- Oxalosuccinic acid, influence of metals on decarboxylation, 201-202
from α -ketoglutaric acid, 208-213
manganese complexes, relation to carboxylase, 201-202, 204-208
- Ochoa reaction, 199-213
quantitative determination, 202
relation to citric acid cycle, 169
synthesis and properties, 199-208
- Oxidase, D-amino acid, in plants, 300
pyrrolic acid, in plants, 300
- Oxidation-reduction systems of sulfur compounds in plants, 223-224
- Oxidizability of hydrocarbons by microorganisms, 454-462, 467
- Oxygen consumption as criterion of microbial attack on hydrocarbons, 446-447
- Oxygen-transferring agents in tobacco leaves, 346-349, 373-375, 382-386
- Oxygen uptake of fermenting tobacco, 344-349
- Oxyphenols from microbial oxidation of hydrocarbons, 467-469
- P
- Pantothenic acid in citric acid cycle, 221-222
- Papain, 300-303
action in blood clotting, 12
and sulphydryl groups, 227
- Pectins, changes during fermentation of tobacco, 340, 366-368, 396, 402
- L-Penicillamine, penicillin from, 254
- Penicillase, destruction of penicillin by, 253
- Penicillin(s), in plants, 227, 250-256
mechanism of synthesis *in vivo*, 255-256
relation to cysteine in plants, 254, 269
types, 250-251
- Pentosans, changes during fermentation of tobacco, 340, 368-369, 402
- Peptidase, in tobacco, changes during processing, 414
relation to structure of alkaline phosphatase, 116-117
role of metal ions, 104
- Peptides, linkages to form proteins, 286-288
- Pepsin, action on fibrinogen, 32
- Peroxidase in tobacco, changes during processing, 414, 415, 421
- Petroleum. See also *Hydrocarbons*.
action of microorganisms on, 444-445, 447, 449
geomicrobiological prospecting for, 449, 455
microbial modification, 470-474
products, action of microorganisms on, 473-474
- Phalloidin, in plants, 285, 295-296
- Phenols. See also *Polyphenols*.
changes during fermentation of tobacco, 340, 373-375, 417
- Phenolsulfatase in plants, 311
- Phenoloxidase in tobacco, changes during processing, 414
- Phenylalanine, effect on indole production by *Escherichia coli*, 77-81
- β -Phenylethyl mustard oil, occurrence, 265

- Phosphatase, acid, 85-86, 300
 inactivation, 90
 alkaline, 83-122
 activation, by amino acids, 101, 106-107
 by divalent cations, 98-100, 102-104, 110-111
 by Mg^{++} , 89-93
 constitution, 107-117
 effect of substrates on activity, 88-89
 factors affecting activity, 94-107
 physiological and pathological chemistry, 83
 preparation, 87-93
 properties, 89-93
 specificity, 86-89, 104-105
 structure, 112-117
 variations due to origin, 104-105
 comparison of acid and alkaline, 85-86
 in *Pseudomonas saccharophila*, 125
 isodynamics, 84-85
 mechanism of catalysis by, 113-117
 multiple pH optima, 84-85
- Phosphate, in citric acid cycle, 189-190, 211-212, 214
- Phosphate bonds, energy rich, use in glycosidic bond formation, 128
- Phosphate esters, synthesis, by alkaline phosphatase, 105-107
- Phosphodiesterase, pH optimum, 84
- Phosphoglucomutase, in *Pseudomonas putrefaciens*, 123-124
 in utilization of maltose, 124
- Phosphohexoisomerase, in *Pseudomonas putrefaciens*, 123-124
 in utilization of maltose, 124
- Phosphomonoesterase. See also *Alkaline phosphatase*.
 alkaline, specificity, 86-89
 classification, 86-88
- Phosphorolysis in synthesis of sucrose, 126-129
- Phosphorylase, starch, effect of arsenate on, 127
 sucrose, as "transglucosidase," 138-141
 use in synthesis of disaccharides, 123-143
- Phosphorylation. See *Transphosphorylation, ATP*.
- Photosynthesis, relation to Ochoa reaction, 212-213
- Phytochemistry of sulfur, 223-323
- Phytoproteases, 300
- Phytases, specificity, 87
- Pigments. See also under individual pigments.
 changes during fermentation of tobacco, 372-373
 from microbial action on hydrocarbons, 469-470, 479
- Plants, sulfur metabolism, 223-323
- Plasma, cofactor, 37-38
 decalcification by ion-exchange resins, 15
 by phosphates, 15
 proteins, binding to Ca^{++} , 14
 thromboplastin and autocatalysis, 7-13
 thromboplastinogen in, 7-13, 16-17, 27-28
- Plasmakinin, identity, 10
- Plasmin and blood clotting, 12, 22, 32
- Platelets, blood, and thromboplastinogen, 9-12
 protection by silicone film, 16-17
 role in clotting, 16-17
- Platelet enzyme, 11-12
- Polarity of molecule and inhibitor activity, 72-74
- Polypeptides, sulfur-containing, 288-297
- Polyphenols, activity during fermentation of tobacco, 346-349, 373-375, 381, 396, 417
 condensation with amino acids, 381, 382-386, 408, 429
 from biological oxidation of benzene, 469
- Polyphenol oxidase, in plant respiration, 374-375, 417
- Polyphosphatases, specificity, 86
- Polysaccharide sulfuric acid esters, 23-4235
- Polysaccharide synthesis, comparison with sucrose synthesis, 140-141
 energy source, 128-129, 141
- Polythionic acids in plant metabolism, 229-232
- Potassium ions, concentration changes in tryptophanase activity, 78
- Preservatives, hydrocarbon, attack by microorganisms, 451-452, 452-453, 453-454, 471
- Proaccelerin and blood clotting, 28
- Profibrin, 29-30, 31
- Pro-prothrombinase, 28
- Proserozyme, 13, 27-28
- Protamine, effect on blood coagulability, 37
 precipitation of fibrinogen, 35
- Protamine-heparin compound, 34
- Proteases, thromboplastic activity, 12

- Protein-Ca⁺⁺ binding, 14
 Proteins, disulfide bridges in, 278, 286-288
 Prothrombin. See also *Thrombin*.
 activation by various enzymes, 12-13, 21-22
 conversion to thrombin, 16-17, 21
 role of Ca⁺⁺, 14-15
 determination, 17-20
 in hemophilic plasma, 10-11
 nature, 3, 23-28
 preparation, 20-23
 Prothrombin-A. See *Factor 5*.
 Prothrombin-B, 24
 Prothrombin time, and Schütz law, 5
 relation to prothrombin concentration, 17-20
 Prothrombinase, 28
 Prothrombinogenase, 28
 Prothrombokinase. See *Thromboplastinogen*.
 Prothrombokinin. See *Thromboplastinogen*.
Pseudomonas putrefaciens, source of sucrose phosphorylase, 123-124
Pseudomonas saccharophila, source of sucrose phosphorylase, 123-143
 Pyranose-furanose, equilibrium mixture of D-fructose, 132
 Pyridoxal phosphate in tryptophan metabolism, 59, 61-62, 62-64, 65, 70
 Pyridoxal-pyridoxamine conversion, function, 62-63
 Pyridoxine, in plants, with relation to thiamine, 246, 247
 Pyrophosphatase(s), alkaline, role of metal ions, 104
 specificity, 86
 Pyrroacemic acid, in plants, 300
 relation to fatty acid metabolism, 186
 Pyruvate-oxalacetate condensation, effect of streptomycin on, 161
 Pyruvic acid. See also *Citric acid cycle*.
 degradation in animal tissues, 180-182
 in tryptophan metabolism, 61-62, 63-64, 68

Q

- Quercetin. See also *Polyphenols*.
 in tobacco leaves, 347-349, 373-375
 Quinones, condensation with amino acids, 381, 382-386, 429

R

- Raffinose, in formation of fructose polymer, 141
 metabolism in *Pseudomonas saccharophila*, 124-125
 Raney nickel, effect on tryptophan metabolism, 68
 Raphanin, occurrence, properties, 267
 Reactivation, of alkaline phosphatase, 110-111, 116-117
 of enzymes, 102-104, 110-111, 116-117
 Redoxase(s), definition, 306
 sulfur specific, 306-310
 Redox potentials, and sulfur metabolism in plants, 228-229, 289-295
 of the cysteine-cystine system, 281-282
 Resins, changes during fermentation of tobacco, 370-372, 396, 402
 Resonance stabilization, and mechanism of tryptophanase action, 62-64, 72-74
 Respiration, in plants, effect of sulfur deficiency, 225
 tissue, effect of streptomycin on, 161
 Respiratory quotient(s), in microbial action on hydrocarbons, 446-447, 465-466
 of tobacco during fermentation, 342-349
 Rhodanide, inhibition of certain bacteria, 231
 Riboflavin, antagonism to mepacrine, 69
 in tryptophanase, 60-62
 Ribonuclease, effect of penicillin on activity, 254
 Roots, toxic effect of thiosulfate on, 231
 Rubber. See also *Hydrocarbons*.
 action of microorganisms on, 444-445, 447, 470, 474-476
 Rutin. See also *Polyphenols*.
 in tobacco leaves, 347-349, 373-376

S

- Saccharase, reactivation, 103. See also *Invertase*, *Saccharase*.
 Sakaguchi reaction, inhibition, 288
 Salt effect and clotting of blood, 30-32
 "Schütz law" and clotting time of blood, 4-5
 Serine, effect on indole production from tryptophan, 58-60, 62, 77
 in tryptophan synthesis, 71-74

- Serine (*continued*)
 relation to sulfur metabolism, 280-281
- Serozyme, 13. See also *Prothrombin*.
- Sewage, relation to microbial metabolism of hydrocarbons, 449, 451, 463, 465-466
- Silicones, use in study of blood clotting, 15-17
- Sinalbin, occurrence, 266
- Single electron transfers and degradation of tryptophan, 62-64, 69
- Sinigrin, occurrence, 260
- Smoking properties, effect of fermentation, 433-434
- Snake venom, action in blood clotting, 12, 27
 thromboplastin in, 6, 19-20
- Species-specificity, of fibrinogen, 31
 of thromboplastin action, 6
- Specificity, of action of hydrocarbons on microorganisms, 452-453
 of alkaline phosphatase, 86-89, 104-105
 of microbial attack on hydrocarbons, 454-456
 of sucrose phosphorylase, 129-131
- Staphylocoagulase, action on fibrinogen, 33, 35
- Streptomine, from streptomycin, 149-150
 synthesis, 158-160
- Streptidine, 147-149, 149-150, 151, 160
 linkage to streptobiosamine in streptomycin, 155-156
 synthesis, 158-160
- Streptobiosamine, 148-149, 151, 154-155, 160, 161-162
 linkage to streptidine in streptomycin, 155-156
- Streptomyces* antibiotics, 145-166
- Streptomycin, 145-166
 colorimetric determination, 157
 evidence of linkage, 155-156
 hydrolysis products, 149-155
 relation of structure to antibiotic activity, 160-161
 site of action, 161
 structure, 147-149
- Streptose, 147-149, 152-154
- Streptothricin, 146
- Strepturea from streptomycin, 149-150
- Strontium ions, promotion of citric acid formation, 215
- Substrate-enzyme combination, mechanism, 72-74
- Succinic acid. See also *Citric acid cycle*.
- Succinic acid (*continued*)
 degradation in yeast, 173-176
- Sucrase. See also *Invertase*, *Saccharase*.
 in tobacco, changes during processing, 414, 423
- Sucrose, synthesis, 123-132, 138-141
 energy for, 128-129
 mechanism, 126-129
 synthetic, structure, 131-132
- Sucrose phosphorylase. See *Phosphorylase*.
- Sugars, reaction with amino acids in aging of tobacco, 408
- Sulfanilamide, acetylation, 221-222
- Sulfatases in plants, 310-311
- Sulfates in plant metabolism, 223-224, 225, 229-232, 308
 reduction in microbial attack on hydrocarbons, 448, 449, 470, 479
- Sulfhydryl groups, and blood clotting, 33
 in plant metabolism, 268-284
 in protein synthesis, 286-288
 relation to activity of alkaline phosphatase, 97-98, 101
- Sulfides in amino acid and peptide complexes, 232
- Sulfite formation in the intermediate metabolism of sulfur in plants, 287
- Sulfonatability of oils, relation to toxicity, 454
- Sulfonic acids in plant metabolism, 236
- Sulfoxides, nonnitrogenous alicyclic, in plant metabolism, 257-259
- Sulfoxycysteine, 282
- Sulfur, compounds in higher plants, 227
 deficiency, effect on living cell, 224, 225
 elementary, and plant metabolism, 229-232
 fungicidal action, 238
 in the formation of chlorophyll in plants, 224
 metabolism in green plants, effect of pH on influence of redox potential, 228-229
 of plants, enzymes involved, 306-311
 of proteins, effect of microorganisms, 230
 phytochemical cycle, 228
 phytochemistry, 223-223
- Sulfurase, occurrence, 307-308
- Sulfur bacteria, 232-234
 oxidation of thiosulfate, 231
- Sulfuric acid esters, in plant metabolism, 234-236

- Sulfuric acid esters (*continued*)
in the organs of higher plants, 226-227
- Sulfurous acid in plant metabolism, 236-238
- Sweat. See also *Fermentation of tobacco*.
of cigar leaf tobaccos, 358-361, 361-399
- Sweat processes for tobacco, 327-333
microbial activity, 409-412, 415-425
- Synergism among factors affecting alkaline phosphatase, 102-104
- Synthesis, of disaccharides with bacterial enzymes, 123-143
of polysaccharides by enzymes, 140-141
- T
- Takadiastase, inhibition of penicillin, 253
in plants, 311
- Tannins in tobacco, 347-349, 373-375
- Terthienyl in plants, 256-257
- Tetranitromethane (TNM), effect on blood clotting, 23
- Tetrathionate, oxidation of thiols by, 230-231
- Thermogenesis as measure of fermentative activities in tobacco, 415-416
- Thetins, in plants, 241
- Thiamine in plants, 227, 243-247
relation to cysteine in plants, 269
- Thioaldehydes, synthesis in plants, 259-260
- Thioethers, aliphatic, formation in plant cells, 239-240
in the formation of sulfoxides and sulfones, 239
role in metabolism of plants, 238-257
- Thioglucosidase in plants, 310
- Thioglycolic acid, effect on growth of pneumococcus, 225
- Thioenzymes of plant origin, 300-306
- Thiol groups, relation to activity of alkaline phosphatase, 97-98, 101
- Thiols, oxidation in plant metabolism, 226
- Thiosinamine, germination promoting properties, 260-261
- Thiosulfate, effect on higher plants, 231
- Thiourea in plants, 260-262
- Threonine, effect of streptomycin on oxidation, 161
- Thrombin. See also *Prothrombin*.
action on blood platelets, 11-12
- Thrombin (*continued*)
autocatalytic formation, 8
co-inhibitor, 35-36
from clotting globulin, 10
mechanism of formation, 25
preparation, 20-23
reaction with fibrinogen, 32
reactions in formation, 17
standardization with ninhydrin, 5
- Thrombinogenase, 28
- Thrombokinase. See *Thromboplastin*.
- Thromboplastin, 2, 3-7, 7-13, 16-17, 19-20
- Thromboplastinogen. See also *Thromboplastin*.
- Thromboplastinogen, 2, 7-13, 16-17
relation to factor 5, 27-28
- Thrombosis, antithrombin in, 37
- Thrombozyme in blood, 13
- Tin, effect on tryptophan metabolism, 68
- TNM. See *Tetranitromethane*.
- Tobacco leaf, chemical changes during fermentation and aging, 325-441
- Toluidine blue, effect on blood coagulability, 37
- Toxicity, of hydrocarbons, 451-452, 452-453, 453-454
of organic halogen compounds, 277-278
- Transaminase, and pyridoxal phosphate, 62, 70
glutamic-aspartic, and pyridoxamine phosphate, 63, 65
in plants, 300
- Transglucosidase, action of sucrose phosphorylase, 140-141
- "Transglycosidases" in synthesis of di- and polysaccharides, 138-141
- Transphosphorylation systems in citric acid cycle, 189-190
- Tricarboxylic acid. See under individual acids.
- Tricarboxylic acid cycle. See also *Citric acid cycle*.
relation to tobacco curing, 326-327
- Trypsin, clotting of plasma by, 12, 21-22
- Tryptase, plasma, 13
- Tryptophan, biosynthesis, 71-74
in fibrin, 30
metabolism, 51-82
- Tryptophanase, nature of the enzyme, 60-62
preparation, 65
properties, 65-68
- Tryptophanase-tryptophan reaction, 51-82

Tyrosinase, mushroom, action on catechols, 383

Tyrosine, effect on indole production by *Escherichia coli*, 77-81

U

Ultraviolet light, sensitivity of proteins to, 288

Ureas, peroxidase-inhibiting and anti-thyroid action, 261

Urease, 227, 300, 303-306
activation by amino acids, 100

Uscharin in plant metabolism, 256

V

Verdoperoxidase, relation to cytochrome, 61

Vinyl sulfide in plants, 242

Virus proteins in plants, 297-299

Viscotoxin in plants, 285, 296-297

Vitamin(s). See under specific name (e.g., *Thiamine*).

Vitamin K and blood clotting, 3, 20, 24, 27

VPO. See *Verdoperoxidase*.

W

Warburg-Christian enzyme-coenzyme system in plants, 309

Water retention in tobacco during fermentation, 354-355

Waxes, changes during fermentation of tobacco, 370-372, 396

X

Xanthophyll in tobacco, 372

Y

Yeasts, action on nicotine, 432

citric acid cycle in, 169-177, 178-180, 189-190

sulfur metabolism, 227, 230, 238, 308-309

thromboplastin in, 6

Z

Zinc ions, effect on alkaline phosphatase, 96, 99, 102-104, 106-107, 110
in citric acid cycle, 201

Zymohexase, in plants, 300
role of metal ions, 104

Advances in Enzymology

CUMULATIVE INDEX, VOLUMES I-X

A. Author Index

	VOL.	PAGE
<i>Agner, Kjell</i> , Verdoperoxidase.....	III	137
<i>Astbury, W. T.</i> , X-Rays and the Stoichiometry of the Proteins.....	III	63
<i>Astrup, Tage</i> , Blood Clotting and Related Processes.....	X	1
<i>Barron, E. S. Guzman</i> , Mechanisms of Carbohydrate Metabolism. An Essay on Comparative Biochemistry.....	III	149
<i>Berger, Julius</i> , see <i>Johnson, Marvin J.</i>		
<i>Bergmann, Max</i> , A Classification of Proteolytic Enzymes.....	II	49
<i>Bergmann, Max</i> , and <i>Fruton, Joseph S.</i> , The Specificity of Protein- ases.....	I	63
<i>Bergström, Sune</i> , and <i>Holman, Ralph T.</i> , Lipoxidase and the Autox- idation of Unsaturated Fatty Acids.....	VIII	425
<i>Bersin, Theodor</i> , Die Phytochemie des Schwefels.....	X	223
<i>Blaschko, H.</i> , The Amino Acid Decarboxylases of Mammalian Tis- sue.....	V	67
<i>Breusch, F. L.</i> , The Biochemistry of Fatty Acid Catabolism.....	VIII	343
<i>Brink, Norman G.</i> , and <i>Folkers, Karl</i> , Some Aspects of Streptomy- cin and Other Streptomyces Antibiotics.....	X	145
<i>Brode, Wallace R.</i> , The Absorption Spectra of Vitamins, Hormones, and Enzymes.....	IV	269
<i>Brooks, S. C.</i> , Permeability and Enzyme Reactions.....	VII	1
<i>Bull, Henry B.</i> , Protein Structure.....	I	1
<i>Chaikoff, I. L.</i> , and <i>Entenman, C.</i> , Antifatty-Liver Factor of the Pancreas—Present Status.....	VIII	171
<i>Chargaff, Erwin</i> , The Coagulation of Blood.....	V	31
<i>Clifton, C. E.</i> , Microbial Assimilations.....	VI	269
<i>Cruess, W. V.</i> , The Role of Microorganisms and Enzymes in Wine Making.....	III	349
<i>Dam, Henrik</i> , Vitamin K, Its Chemistry and Physiology.....	II	285
<i>Dawson, C. R.</i> , see <i>Nelson, J. M.</i>		
<i>Dawson, Ray F.</i> , Alkaloid Biogenesis.....	VIII	203
<i>Delbrück, Max</i> , Bacterial Viruses (Bacteriophages).....	II	1
<i>Doudoroff, M.</i> , see <i>Hassid, W. Z.</i>		
<i>Engelhardt, V. A.</i> , Adenosinetriphosphatase Properties of Myosin.....	VI	147
<i>Entenman, C.</i> , see <i>Chaikoff, I. L.</i>		
<i>Folkers, Karl</i> , see <i>Brink, Norman G.</i>		
<i>Franck, J.</i> , and <i>Gaffron, H.</i> , Photosynthesis, Facts and Interpreta- tions.....	I	199
<i>Frankenburg, Walter G.</i> , Chemical Changes in the Harvested To-		

	VOL.	PAGE
bacco Leaf. Part I. Chemical and Enzymic Conversions during the Curing Process.....	VI	309
<i>Frankenburg, Walter G.</i> , Chemical Changes in the Harvested Tobacco Leaf. Part II. Chemical and Enzymic Conversions during Fermentation and Aging.....	X	325
<i>Fromageot, Claude</i> , Oxidation of Organic Sulfur in Animals.....	VII	369
<i>Fruton, Joseph S.</i> , see <i>Bergmann, Max</i>		
<i>Fuller, W. H.</i> , see <i>Norman, A. G.</i>		
<i>Gaffron, H.</i> , see <i>Franck, J.</i>		
<i>Gale, Ernest F.</i> , The Bacterial Amino Acid Decarboxylases.....	VI	1
<i>Geddes, W. F.</i> , The Amylases of Wheat and Their Significance in Milling and Baking Technology.....	VI	415
<i>Gilder, H.</i> , see <i>Granick, S.</i>		
<i>Glick, David</i> , Principles of Enzymic Histo- and Cytochemistry....	IX	585
<i>Granick, S.</i> , and <i>Gilder, H.</i> , Distribution, Structure, and Properties of the Tetrapyrroles.....	VII	305
<i>Green, D. E.</i> , Enzymes and Trace Substances.....	I	177
<i>Greenstein, Jesse P.</i> , Recent Progress in Tumor Enzymology.....	III	315
<i>Greenstein, Jesse P.</i> , Dehydropeptidases.....	VIII	117
<i>Gulick, Addison</i> , The Chemical Formulation of Gene Structure and Gene Action.....	IV	1
<i>Happold, Frank C.</i> , Tryptophanase-Tryptophan Reaction.....	X	51
<i>Harris, P. L.</i> , see <i>Hickman, K. C. D.</i>		
<i>Hassid, W. Z.</i> , and <i>Doudoroff, M.</i> , Synthesis of Disaccharides with Bacterial Enzymes.....	X	123
<i>Heidelberger, Michael</i> , and <i>Mayer, Manfred M.</i> , Quantitative Studies on Complement.....	VIII	71
<i>Herbst, Robert M.</i> , The Transamination Reaction.....	IV	75
<i>Hesse, Albert</i> , Industrial Biosyntheses. Part I. Fats.....	IX	653
<i>Hestrin, S.</i> , see <i>Leibowitz, J.</i>		
<i>Hevesy, G.</i> , Some Applications of Radioactive Indicators in Turn-over Studies.....	VII	111
<i>Hickman, K. C. D.</i> , and <i>Harris, P. L.</i> , Tocopherol Interrelationships.....	VI	469
<i>Hildebrandt, F. M.</i> , Recent Progress in Industrial Fermentation....	VII	557
<i>Hoagland, Charles L.</i> , States of Altered Metabolism in Diseases of Muscle.....	VI	193
<i>Hofmann, Klaus</i> , The Chemistry and Biochemistry of Biotin.....	III	289
<i>Holman, Ralph T.</i> , see <i>Bergström, Sune</i>		
<i>Holzappel, Luise</i> , Physikalisch-chemische Gesichtspunkte zum Problem der Virusaktivität.....	I	43
<i>Hopkins, R. H.</i> , The Actions of the Amylases.....	VI	389
<i>Hotchkiss, Rollin D.</i> , Gramicidin, Tyrocidine, and Tryothricin....	IV	153
<i>Jensen, H.</i> , and <i>Tenenbaum, Leon E.</i> , The Influence of Hormones on Enzymatic Reactions.....	IV	257
<i>Johnson, Frank H.</i> , Bacterial Luminescence.....	VII	215
<i>Johnson, Marvin J.</i> , and <i>Berger, Julius</i> , The Enzymatic Properties of Peptidases.....	II	69
<i>Joslyn, M. A.</i> , Enzyme Activity in Frozen Vegetable Tissue.....	IX	613
<i>Kavanagh, Frederick</i> , Antibacterial Substances from Fungi and Green Plants.....	VII	461

	VOL.	PAGE
<i>Kleinzeller, A.</i> , Synthesis of Lipides	VIII	299
<i>Krebs, H. A.</i> , The Intermediary Stages in the Biological Oxidation of Carbohydrate	III	191
<i>Kurssanov, A. L.</i> , Untersuchung enzymatischer Prozesse in der lebenden Pflanze	I	329
<i>Lauffer, Max A., Price, W. C., and Petre, A. W.</i> , The Nature of Viruses	IX	171
<i>Leibowitz, J., and Hestrin, S.</i> , Alcoholic Fermentation of the Oligosaccharides	V	87
<i>Lipmann, Fritz</i> , Metabolic Generation and Utilization of Phosphate Bond Energy	I	99
<i>Lipmann, Fritz</i> , Acetyl Phosphate	VI	231
<i>Lynen, F.</i> , see <i>Martius, C.</i>		
<i>McIlwain, Henry</i> , Interrelations in Microorganisms between Growth and the Metabolism of Vitamin-like Substances	VII	409
<i>McLaren, A. Douglas</i> , Photochemistry of Enzymes, Proteins, and Viruses	IX	75
<i>Mann, T.</i> , Metabolism of Semen	IX	329
<i>Martius, C., and Lynen, F.</i> , Probleme des Citronensäurecyklus	X	167
<i>Mayer, Manfred M.</i> , see <i>Heideberger, Michael</i>		
<i>Meyer, Kurt H.</i> , The Chemistry of Glycogen	III	109
<i>Michaëlis, L.</i> , Some Aspects of Reversible Step Reactions	IX	1
<i>Mirsky, A. E.</i> , Chromosomes and Nucleoproteins	III	1
<i>Monné, Ludwik</i> , Functioning of the Cytoplasm	VIII	1
<i>Mull, Robert P.</i> , see <i>Nord, F. F.</i>		
<i>Nelson, J. M., and Dawson, C. R.</i> , Tyrosinase	IV	99
<i>Nguyen-Van Thoai</i> , see <i>Roche, Jean</i>		
<i>Nord, F. F., and Mull, Robert P.</i> , Recent Progress in the Biochemistry of Fusaria	V	165
<i>Nord, F. F., and Vitucci, J. C.</i> , Certain Aspects of the Microbiological Degradation of Cellulose	VIII	253
<i>Norman, A. G., and Fuller, W. H.</i> , Cellulose Decomposition by Microorganisms	II	239
<i>Petre, A. W.</i> , see <i>Lauffer, Max A.</i>		
<i>Pfiffner, J. J.</i> , The Adrenal Cortical Hormones	II	325
<i>Pigman, William Ward</i> , Specificity, Classification, and Mechanism of Action of the Glycosidases	IV	41
<i>Pirie, N. W.</i> , Physical and Chemical Properties of Tomato Bushy Stunt Virus and the Strains of Tobacco Mosaic Virus	V	1
<i>Potter, V. R.</i> , Biological Energy Transformations and the Cancer Problem	IV	201
<i>Price, W. C.</i> , see <i>Lauffer, Max A.</i>		
<i>Ritchie, Patrick D.</i> , Recent Views on Asymmetric Synthesis and Related Processes	VII	65
<i>Roberts, E. A. Houghton</i> , The Chemistry of Tea Fermentation	II	113
<i>Roche, Jean, and Nguyen-Van Thoai</i> , Phosphatase Alcaline	X	83
<i>Runnström, John</i> , The Mechanism of Fertilization in Metazoa	IX	241
<i>Schales, Otto</i> , Kidney Enzymes and Essential Hypertension	VII	513
<i>Schlenk, F.</i> , Enzymatic Reactions Involving Nicotinamide and Its Related Compounds	V	207
<i>Schlenk, F.</i> , Chemistry and Enzymology of Nucleic Acids	IX	455

	VOL.	PAGE
<i>Seifriz, William</i> , The Properties of Protoplasm, with Special Reference to the Influence of Enzymic Reactions	VII	35
<i>Sevag, M. G.</i> , Enzyme Problems in Relation to Chemotherapy, "Adaptation," Mutations, Resistance, and Immunity	VI	33
<i>Sizer, Irwin W.</i> , Effects of Temperature on Enzyme Kinetics	III	35
<i>Smythe, C. V.</i> , Some Enzyme Reactions on Sulfur Compounds	V	237
<i>Stearn, A. E.</i> , Kinetics of Biological Reactions with Special Reference to Enzymic Processes	IX	25
<i>Stotz, Elmer</i> , Pyruvate Metabolism	V	129
<i>Street, H. E.</i> , Nitrogen Metabolism of Higher Plants	IX	391
<i>Sumner, James B.</i> , The Chemical Nature of Catalase	I	163
<i>Tamiya, Hiroshi</i> , Atmung, Gärung und die sich daran beteiligenden Enzyme von <i>Aspergillus</i>	II	183
<i>Tenenbaum, Leon E.</i> , see <i>Jensen, H.</i>		
<i>Theorell, Hugo</i> , Heme-Linked Groups and Mode of Action of Some Hemoproteins	VII	265
<i>Van Niel, C. B.</i> , The Bacterial Photosyntheses and Their Importance for the General Problem of Photosynthesis	I	263
<i>Van Slyke, Donald D.</i> , The Kinetics of Hydrolytic Enzymes and Their Bearing on Methods for Measuring Enzyme Activity	II	33
<i>Vitucci, J. C.</i> , see <i>Nord, F. F.</i>		
<i>Vonk, H. J.</i> , Die Verdauung bei den niederen Vertebraten	I	371
<i>Walker, T. K.</i> , Pathways of Acid Formation in <i>Aspergillus niger</i> and in Related Molds	IX	537
<i>Werkman, C. H.</i> , and <i>Wood, H. G.</i> , Heterotrophic Assimilation of Carbon Dioxide	II	135
<i>Williams, Roger J.</i> , The Chemistry and Biochemistry of Pantothenic Acid	III	253
<i>Witzemann, Edgar J.</i> , A Unified Hypothesis of the Reciprocal Integration of Carbohydrate and Fat Catabolism	II	265
<i>Wood, H. G.</i> , see <i>Werkman, C. H.</i>		
<i>Woolley, D. W.</i> , Biological Antagonisms between Structurally Related Compounds	VI	129
<i>Zeller, E. Albert</i> , Diamin-Oxydase	II	93
<i>Zeller, E. Albert</i> , Enzymes of Snake Venoms and Their Biological Significance	VIII	459
<i>ZoBell, Claude E.</i> , Assimilation of Hydrocarbons by Microorganisms	X	443

B. Subject Index

<i>Absorption Spectra, Vitamins, Hormones, Enzymes</i> (Brode)	IV	269
<i>Acetyl Phosphate</i> (Lipmann)	VI	231
<i>Acid Formation in Aspergillus niger and in Related Molds</i> (Walker)	IX	537
"Adaptation," Mutations, Resistance, Immunity, and Chemotherapy, and Enzyme Problems (Sevag)	VI	33
<i>Adenosinetriphosphatase Properties of Myosin</i> (Engelhardt)	VI	147
<i>Adrenal Cortical Hormones</i> (Pffifner)	II	325
<i>Alcoholic Fermentation of the Oligosaccharides</i> (Leibowitz and Hestrin)	V	87
<i>Alkaline Phosphatase</i> (Roche and Nguyen-Van Thoai)	X	83

	VOL.	PAGE
<i>Alkaloid Biogenesis</i> (Dawson).....	VIII	203
<i>Amino Acid Decarboxylases, Bacterial</i> (Gale).....	VI	1
<i>Amino Acid Decarboxylases of Mammalian Tissue</i> (Blaschko).....	V	67
<i>Amylases</i> (Hopkins).....	VI	389
<i>Amylases of Wheat and Their Significance in Milling and Baking Technology</i> (Geddes).....	VI	415
<i>Antagonisms, Biological, between Structurally Related Compounds</i> (Woolley).....	VI	129
<i>Antibacterial Substances from Fungi and Green Plants</i> (Kavanagh).....	VII	461
<i>Antibiotics, Streptomycin and Other Streptomyces</i> (Brink and Folkers).....	X	145
<i>Antifatty-Liver Factor of Pancreas</i> (Chaikoff and Entenman).....	VIII	171
<i>Aspergillus niger and Related Molds, Acid Formation</i> (Walker).....	IX	537
<i>Aspergillus: Respiration and Fermentation</i> (Tamiya).....	II	183
<i>Assimilation, Heterotrophic, of Carbon Dioxide</i> (Werkman and Wood).....	II	135
<i>Assimilations, Microbial</i> (Clifton).....	VI	269
<i>Asymmetric Synthesis and Related Processes, Recent Views</i> (Ritchie).....	VII	65
<i>Autoxidation of Unsaturated Fatty Acids, and Lipoxidase</i> (Bergström and Holman).....	VIII	425
<i>Bacterial Amino Acid Decarboxylases</i> (Gale).....	VI	1
<i>Bacterial Enzymes, Synthesis of Disaccharides</i> (Hassid and Doudoroff).....	X	123
<i>Bacterial Luminescence</i> (Johnson).....	VII	215
<i>Bacterial Photosyntheses</i> (van Niel).....	I	263
<i>Bacterial Viruses</i> (Delbrück).....	II	1
<i>Bacteriophages</i> (Delbrück).....	II	1
<i>Biogenesis, Alkaloid</i> (Dawson).....	VIII	203
<i>Biological Antagonisms between Structurally Related Compounds</i> (Woolley).....	VI	129
<i>Biological Reactions and Enzymic Processes, Kinetics</i> (Stearn).....	IX	25
<i>Biosyntheses, Industrial, Fats</i> (Hesse).....	IX	653
<i>Biotin, Chemistry and Biochemistry</i> (Hofmann).....	III	289
<i>Blood Clotting and Related Processes</i> (Astrup).....	X	1
<i>Blood Coagulation</i> (Chargaff).....	V	31
<i>Cancer Problem and Energy Transformations</i> (Potter).....	IV	201
<i>Carbohydrate, Biological Oxidation</i> (Krebs).....	III	191
<i>Carbohydrate and Fat Catabolism, Unified Hypothesis</i> (Witzemann).....	II	265
<i>Carbohydrate Metabolism, Mechanisms</i> (Barron).....	III	149
<i>Carbon Dioxide, Heterotrophic Assimilation</i> (Werkman and Wood).....	II	135
<i>Catalase, Chemical Nature</i> (Sumner).....	I	163
<i>Cellulose Decomposition by Microorganisms</i> (Norman and Fuller).....	II	239
<i>Cellulose, Microbiological Degradation</i> (Nord and Vitucci).....	VIII	253
<i>Chemotherapy, "Adaptation," Mutations, Resistance, and Immunity, and Enzyme Problems</i> (Sevag).....	VI	33
<i>Chromosomes</i> (Mirsky).....	III	1
<i>Citric Acid Cycle</i> (Martius and Lynen).....	X	167
<i>Clotting of Blood and Related Processes</i> (Astrup).....	X	1
<i>Coagulation of Blood</i> (Chargaff).....	V	31
<i>Complement, Quantitative Studies</i> (Heidelberger and Mayer).....	VIII	71
<i>Cyto- and Histochemistry, Enzymic</i> (Glick).....	IX	585

	VOL.	PAGE
<i>Cytoplasm, Functioning</i> (Monné).....	VIII	1
<i>Decarboxylases, Bacterial Amino Acid</i> (Gale).....	VI	1
<i>Dehydropeptidases</i> (Greenstein).....	VIII	117
<i>Diamin-Oxydase</i> (Zeller).....	II	93
<i>Disaccharides, Synthesis with Bacterial Enzymes</i> (Hassid and Doudoroff).....	X	123
<i>Energy Transformations and Cancer Problem</i> (Potter).....	IV	201
<i>Enzyme Activity, in Frozen Vegetable Tissue</i> (Joslyn).....	IX	613
<i>Enzyme Activity, Methods of Measuring</i> (Van Slyke).....	II	33
<i>Enzyme Kinetics, Temperature Effects</i> (Sizer).....	III	35
<i>Enzyme Problems in Relation to "Adaptation," Mutations, Resistance, Immunity, and Chemotherapy</i> (Sevag).....	VI	33
<i>Enzyme Reactions and Permeability</i> (Brooks).....	VII	1
<i>Enzymes, Absorption Spectra</i> (Brode).....	IV	269
<i>Enzymes, Photochemistry</i> (McLaren).....	IX	75
<i>Enzymes of Snake Venoms and Their Biological Significance</i> (Zeller).....	VIII	459
<i>Enzymes and Trace Substances</i> (Green).....	I	177
<i>Enzymic Processes and Biological Reactions, Kinetics</i> (Stearn)....	IX	25
<i>Enzymic Reactions, Influence on Properties of Protoplasm</i> (Seifriz)...	VII	35
<i>Enzymic Reactions and Hormones</i> (Jensen and Tenenbaum).....	IV	257
<i>Essential Hypertension and Kidney Enzymes</i> (Schales).....	VII	513
<i>Fat and Carbohydrate Catabolism, Unified Hypothesis</i> (Witzemann)	II	265
<i>Fats, Industrial Biosyntheses</i> (Hesse).....	IX	653
<i>Fatty Acid Catabolism</i> (Breusch).....	VIII	343
<i>Fatty Acids, Unsaturated, Lipoxidase and Autoxidation</i> (Bergström and Holman).....	VIII	425
<i>Fermentation, Industrial, Recent Progress</i> (Hildebrandt).....	VII	557
<i>Fertilization in Metazoa</i> (Runnström).....	IX	241
<i>Frozen Vegetable Tissue, Enzyme Activity</i> (Joslyn).....	IX	613
<i>Fungi and Green Plants, Antibacterial Substances from</i> (Kavanagh)	VII	461
<i>Fusaria Biochemistry</i> (Nord and Mull).....	V	165
<i>Gene Structure and Action, Chemical Formulation</i> (Gulick).....	IV	1
<i>Glycogen, Chemistry</i> (Meyer).....	III	109
<i>Glycosidases, Specificity, Classification, Mechanism of Action</i> (Pigman).....	IV	41
<i>Gramicidin</i> (Hotchkiss).....	IV	153
<i>Green Plants and Fungi, Antibacterial Substances from</i> (Kavanagh).	VII	461
<i>Growth and Metabolism of Vitamin-like Substances, Interrelations in Microorganisms</i> (McIlwain).....	VII	409
<i>Heme-Linked Groups and Mode of Action of Some Hemoproteins</i> (Theorell).....	VII	265
<i>Hemoproteins, Mode of Action, and Heme-Linked Groups</i> (Theorell)	VII	265
<i>Histo- and Cytochemistry, Enzymic</i> (Glick).....	IX	585
<i>Hormones, Absorption Spectra</i> (Brode).....	IV	269
<i>Hormones, Influence on Enzymic Reactions</i> (Jensen and Tenenbaum)	IV	257
<i>Hydrocarbons, Assimilation by Microorganisms</i> (ZoBell).....	X	443
<i>Hydrolytic Enzymes, Kinetics</i> (Van Slyke).....	II	33
<i>Hypertension, Essential, and Kidney Enzymes</i> (Schales).....	VII	513

	VOL.	PAGE
<i>Immunity, Resistance, "Adaptation," Mutations, and Chemotherapy, and Enzyme Problems (Sevag)</i>	VI	33
<i>Industrial Biosyntheses, Fats (Hesse)</i>	IX	653
<i>Industrial Fermentation, Recent Progress (Hildebrandt)</i>	VII	557
<i>Kidney Enzymes and Essential Hypertension (Schales)</i>	VII	513
<i>Kinetics of Biological Reactions with Special References to Enzymic Processes (Stearn)</i>	IX	25
<i>Kinetics of Hydrolytic Enzymes (Van Slyke)</i>	II	33
<i>Kinetics, Temperature Effects on Enzyme (Sizer)</i>	III	35
<i>Lipides, Synthesis (Kleinzeller)</i>	VIII	299
<i>Lipoxidase, and Autoxidation of Unsaturated Fatty Acids (Bergström and Holman)</i>	VIII	425
<i>Lower Factor, Antifatty-, of Pancreas (Chaikoff and Entenman)</i>	VIII	171
<i>Lower Vertebrata, Digestion (Vonk)</i>	I	371
<i>Luminescence, Bacterial (Johnson)</i>	VII	215
<i>Mammalian Tissue, Amino Acid Decarboxylases (Blaschko)</i>	V	67
<i>Metabolism in Disease of Muscle (Hoagland)</i>	VI	193
<i>Metabolism of Vitamin-like Substances and Growth, Interrelations in Microorganisms (McIlwain)</i>	VII	409
<i>Metazoa, Fertilization (Tunnnström)</i>	IX	241
<i>Microbial Assimilations (Clifton)</i>	VI	269
<i>Microbiological Degradation of Cellulose (Nord and Vitucci)</i>	VIII	253
<i>Microorganisms, Assimilation of Hydrocarbons (ZoBell)</i>	X	443
<i>Microorganisms, Interrelations between Growth and Metabolism of Vitamin-like Substances (McIlwain)</i>	VII	409
<i>Molds, Acid Formation (Walker)</i>	IX	537
<i>Muscle Diseases, Metabolism (Hoagland)</i>	VI	193
<i>Mutations, "Adaptation," Resistance, Immunity, and Chemotherapy, and Enzyme Problems (Sevag)</i>	VI	33
<i>Myosin, Adenosinetriphosphatase Properties (Engelhardt)</i>	VI	147
<i>Nicotinamide, Enzymic Reactions (Schlenk)</i>	V	207
<i>Nitrogen Metabolism of Higher Plants (Street)</i>	IX	391
<i>Nucleic Acids, Chemistry and Enzymology (Schlenk)</i>	IX	455
<i>Nucleoproteins (Mirsky)</i>	III	1
<i>Oligosaccharides, Alcoholic Fermentation (Leibowitz and Hestrin)</i> ..	V	87
<i>Organic Sulfur, Oxidation in Animals (Fromageot)</i>	VII	369
<i>Oxidation of Carbohydrate (Krebs)</i>	III	191
<i>Oxidation of Organic Sulfur in Animals (Fromageot)</i>	VII	369
<i>Pancreas, Antifatty-Liver Factor (Chaikoff and Entenman)</i>	VIII	171
<i>Pantothenic Acid, Chemistry and Biochemistry (Williams)</i>	III	253
<i>Peptidases, Enzymic Properties (Johnson and Berger)</i>	II	69
<i>Permeability and Enzyme Reactions (Brooks)</i>	VII	1
<i>Phosphatase, Alkaline (Roche and Nguyen-Van Thoai)</i>	X	83
<i>Phosphate, Acetyl (Lipmann)</i>	VI	231
<i>Phosphate Bond Energy, Metabolic Generation and Utilization (Lipmann)</i>	I	99
<i>Photochemistry of Enzymes, Proteins, and Viruses (McLaren)</i>	IX	75
<i>Photosyntheses, Bacterial (van Niel)</i>	I	263
<i>Photosynthesis, Facts and Interpretations (Franck and Gaffron)</i>	I	199
<i>Phytochemistry of Sulfur (Bersin)</i>	X	223

	VOL.	PAGE
<i>Plants, Higher, Nitrogen Metabolism</i> (Street).....	IX	391
<i>Plants, Living, Enzymic Processes</i> (Kurssanov).....	I	329
<i>Proteinases, Specificity</i> (Bergmann and Fruton).....	I	63
<i>Protein Structure</i> (Bull).....	I	1
<i>Proteins, Photochemistry</i> (McLaren).....	IX	75
<i>Proteins, X-Rays and Stoichiometry</i> (Astbury).....	III	63
<i>Proteolytic Enzymes, Classification</i> (Bergmann).....	II	49
<i>Protoplasm, Properties, with Special Reference to Influence of Enzymic Reactions</i> (Seifriz).....	VII	35
<i>Pyruvate Metabolism</i> (Stotz).....	V	129
<i>Radioactive Indicators, Applications in Turnover Studies</i> (Hevesy).....	VII	111
<i>Resistance, Immunity, "Adaptation," Mutations, and Chemotherapy, and Enzyme Problems</i> (Sevag).....	VI	33
<i>Respiration of Aspergillus</i> (Tamiya).....	II	183
<i>Semen, Metabolism</i> (Mann).....	IX	329
<i>Snake Venoms, Enzymes of, Biological Significance</i> (Zeller).....	VIII	459
<i>Step Reactions, Reversible</i> (Michaelis).....	IX	1
<i>Stoichiometry of Proteins</i> (Astbury).....	III	63
<i>Streptomycin and Other Streptomyces Antibiotics</i> (Brink and Folkers).....	X	145
<i>Sulfur, Organic, Oxidation in Animals</i> (Fromageot).....	VII	369
<i>Sulfur, Phytochemistry</i> (Bersin).....	X	223
<i>Sulfur Compounds, Enzyme Reactions</i> (Smythe).....	V	237
<i>Tea Fermentation, Chemistry</i> (Roberts).....	II	113
<i>Temperature Effects on Enzyme Kinetics</i> (Sizer).....	III	35
<i>Tetrapyrroles, Distribution, Structure, and Properties</i> (Granick and Gilder).....	VII	305
<i>Tobacco Leaf Chemistry (Part I), during Curing</i> (Frankenburg).....	VI	309
<i>Tobacco Leaf Chemistry (Part II), during Fermentation and Aging</i> (Frankenburg).....	X	325
<i>Tobacco Mosaic Virus, Physical and Chemical Properties</i> (Pirie).....	V	1
<i>Tocopherol Interrelationships</i> (Hickman and Harris).....	VI	469
<i>Tomato Bushy Stunt Virus, Physical and Chemical Properties</i> (Pirie).....	V	1
<i>Trace Substances and Enzymes</i> (Green).....	I	177
<i>Transamination Reaction</i> (Herbst).....	IV	75
<i>Tryptophanase-Tryptophan Reaction</i> (Happold).....	X	51
<i>Tumor Enzymology</i> (Greenstein).....	III	315
<i>Turnover Studies, Applications of Radioactive Indicators</i> (Hevesy).....	VII	111
<i>Tyrocidine</i> (Hotchkiss).....	IV	153
<i>Tyrosinase</i> (Nelson and Dawson).....	IV	99
<i>Tyrothricin</i> (Hotchkiss).....	IV	153
<i>Unsaturated Fatty Acids, Autoxidation, and Lipoxidase</i> (Bergström and Holman).....	VIII	425
<i>Vegetable Tissue, Frozen, Enzyme Activity in</i> (Joslyn).....	IX	613
<i>Venoms, Snake, Enzymes of</i> (Zeller).....	VIII	459
<i>Verdoperoxidase</i> (Agner).....	III	137
<i>Vertebrata, Lower, Digestion</i> (Vonk).....	I	371
<i>Virus Activity, Physicochemical Aspects</i> (Holzapfel).....	I	43
<i>Viruses, Nature of</i> (Laufer, Price, and Petre).....	IX	171
<i>Viruses, Photochemistry</i> (McLaren).....	IX	75

	VOL.	PAGE
<i>Vitamin K</i> (Dam).....	II	285
<i>Vitamins, Absorption Spectra</i> (Brode).....	IV	269
<i>Wheat Amylases, and Their Significance in Milling and Baking Technology</i> (Geddes).....	VI	415
<i>Wine Making, Microorganisms and Enzymes</i> (Cruess).....	III	349
<i>X-Rays of Proteins</i> (Astbury).....	III	63

**For Reference
Only.**