

LA FORMATION D'ALANINE PAR DÉSULFINATION ENZYMATIQUE DE L'ACIDE L-CYSTÉINE-SULFINIQUE

par

CLAUDE FROMAGEOT, FERNANDE CHATAGNER ET BERNADETTE BERGERET

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)

L'acide L-cystéine-sulfinique est actuellement considéré comme un intermédiaire important dans l'ensemble des réactions qui aboutissent, chez les animaux supérieurs, à l'oxydation en sulfate du soufre de la cystéine ou de la cystine¹. FROMAGEOT ET CHATAGNER² ont récemment mis en évidence l'existence d'un enzyme, la *désulfinitase*, dont l'action se manifeste par l'élimination du groupe sulfinique de l'acide cystéine-sulfinique, groupe que l'on retrouve dans le milieu sous forme de sulfite. Cette réaction constitue la voie probablement la plus importante du passage de la forme organique à la forme minérale du soufre. Le sulfite libéré s'oxyde facilement en sulfate dans l'organisme³, mais le sort de la partie organique de la molécule n'était pas encore connu. FROMAGEOT ET CHATAGNER² avaient supposé que l'élimination du groupe sulfinique est accompagnée de la formation d'alanine, mais sans en donner de preuve expérimentale. Nous montrons ici qu'il en est bien ainsi.

Pour mettre en évidence la genèse de l'alanine au cours de la désulfination enzymatique de l'acide cystéine-sulfinique, il convenait de doser simultanément le sulfite libéré et l'alanine éventuellement formée. L'une des meilleures méthodes de dosage de l'alanine est basée sur la mesure de l'acétaldéhyde dégagé par l'action de la ninhydrine sur l'acide aminé⁴. Or, nous avons constaté au cours d'expériences préliminaires que l'action de la ninhydrine sur l'acide cystéine-sulfinique aboutit également à la formation d'acétaldéhyde. Ce fait, qui enlève au dosage de l'alanine toute spécificité en présence d'acide cystéine-sulfinique, est la manifestation d'une désulfination chimique, qu'il nous a paru intéressant d'étudier.

Le présent travail est ainsi consacré d'une part à l'étude de l'action de la ninhydrine sur l'acide cystéine-sulfinique, d'autre part à l'établissement d'une méthode spécifique de dosage de l'alanine présente dans un milieu relativement riche en acide cystéine-sulfinique, d'autre part enfin à la démonstration que la désulfination enzymatique de l'acide cystéine-sulfinique est bien accompagnée, quantitativement, de la formation d'alanine.

I. ACTION DE LA NINHYDRINE SUR L'ACIDE CYSTÉINE-SULFINIQUE

Etant donnée l'analogie existante entre la structure de l'acide cystéine-sulfinique, celle de l'acide cystéique et celle de l'acide aspartique, nous avons étudié parallèlement l'action de la ninhydrine sur ces trois acides, dans les mêmes conditions; de plus, nous avons comparé le comportement des trois acides en question vis-à-vis de la ninhydrine, à celui de l'alanine.

L'acide L-cystéine-sulfinique a été synthétisé à partir de la L-cystine, par l'intermédiaire du L-cystine sulfoxyde, selon la méthode de LAVINE⁶.

L'acide L-cystéique a été obtenu par oxydation de la L-cystéine par le brome, selon la technique de FRIEDMANN⁶.

L'appareil utilisé est celui de ALEXANDER ET SELIGMAN⁴. Dans le ballon à réaction, on introduit 1.0 ml de la solution aqueuse de l'acide aminé, 2.0 ml de solution tampon et 1 ml d'une solution aqueuse de ninhydrine à 1%. On porte à l'ébullition pendant 75 minutes. L'acétaldéhyde éventuellement produit est recueilli dans 8 ml d'une solution aqueuse de bisulfite de sodium à 1%, maintenue dans l'eau glacée. Après cessation de la réaction, le volume de la solution de bisulfite est amené à 10 ml et le dosage de l'acétaldéhyde est fait sur une partie aliquote, par colorimétrie avec le p-hydroxydiphényl, selon la méthode habituelle, en utilisant le photomètre de Pulfrich (filtre S 57).

Les solutions tampons employées sont les suivantes:

pH 1: acide phosphorique 0.24 M (7);

pH 2.4 et pH 4.7: mélanges citrate trisodique + acide citrique 0.10 M (7);

pH 5.5, pH 6.9 et pH 8.4: mélanges phosphates 0.067 M;

pH 10.0: mélange borate de sodium + acide borique 0.10 M.

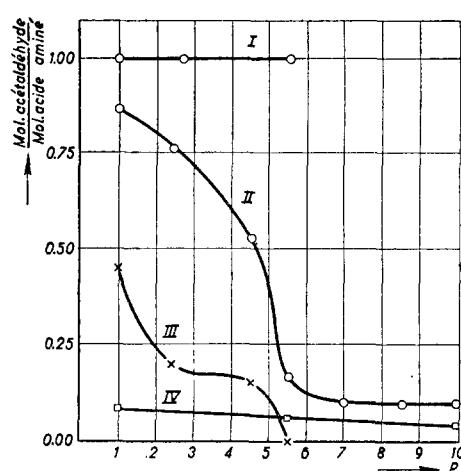


Fig. 1

- I: $\text{HO}_2\text{C}.\text{CH}(\text{NH}_2).\text{CH}_3$
- II: $\text{HO}_2\text{C}.\text{CH}(\text{NH}_2).\text{CH}_2.\text{SO}_2\text{H}$
- III: $\text{HO}_2\text{C}.\text{CH}(\text{NH}_2).\text{CH}_2.\text{CO}_2\text{H}$
- IV: $\text{HO}_2\text{C}.\text{CH}(\text{NH}_2).\text{CH}_2.\text{SO}_3\text{H}$

L'influence du pH de la solution sur la formation d'acétaldéhyde à partir de l'acide cystéine-sulfinique, de l'acide cystéique, de l'acide aspartique et de lalanine, sous l'action de la ninhydrine, est illustrée par la Fig. 1, dont les courbes correspondent à une quantité d'acides aminés de 13.0 micromolécules dans les 4 ml du milieu réactionnel.

Il apparaît tout d'abord que la formation d'acétaldéhyde à partir de lalanine reste quantitative, quel que soit le pH. D'autre part, l'acide cystéine-sulfinique donne lieu à une production importante d'acétaldéhyde, qui dépend considérablement du pH. Cette production, qui atteint 86% de la quantité théoriquement possible à pH 1, baisse avec la concentration en ions H, mais sans s'annuler; elle est encore de 17.2% à pH 5.5 auquel se fait le dosage de lalanine dans la méthode de ALEXANDER ET SELIGMAN⁴, puis descend à 10.3% à pH 7.0, valeur qu'elle garde constante jusqu'à pH 10 au moins. Au cours de ces mesures l'acétaldéhyde a été caractérisé en même temps que dosé par sa réaction colorée avec la p-hydroxydiphényl. Malgré la spécificité de cette réaction, et devant l'importance de la formation d'acétaldéhyde par action de la ninhydrine sur l'acide cystéine-sulfinique, il nous a paru utile de caractériser, d'une façon plus directe l'aldéhyde produit. Pour ce faire, nous avons soumis 2 mg d'acide cystéine-sulfinique à l'action de la ninhydrine à pH 1, dans les conditions expérimentales précédentes; l'acétaldéhyde formé a été recueilli dans une solution saturée à froid de 2.4-dinitrophénylhydrazine dans HCl 2 N; l'hydrazone a été lavée par HCl 2 N, puis à l'eau froide, et recristallisée dans le benzène. Séchée sous vide à 100°, la substance obtenue fond à 162°. Point de fusion du mélange de la substance avec l'acétaldéhyde-2.4-dinitrophényl-hydrazone: 162°. Il s'agit donc bien ici d'acétaldéhyde.

L'acide aspartique donne également naissance à de l'acétaldéhyde, mais en quantités moindres, toutes conditions égales d'ailleurs, que l'acide cystéine-sulfinique. Comme dans le cas de ce dernier, la formation d'aldéhyde décroît avec la concentration en ions

H^+ ; mais ici, cette formation s'annule à $p_H = 5.5$, ce qui permet de doser sans difficulté, à ce p_H , ou à des p_H supérieurs, lalanine en présence d'acide aspartique. On sait d'ailleurs que la genèse d'acétaldéhyde à partir de l'acide aspartique sous l'action de la ninhydrine dépend encore d'autres conditions expérimentales: si on en juge par la décarboxylation en β , la formation d'acétaldéhyde est quantitative par ébullition, à des p_H compris entre 1 et 4.7 en 6 à 8 min, en présence d'un gros excès de ninhydrine⁷.

Quant à l'acide cystéique, sa décomposition en acétaldéhyde est très faible, même à p_H 1 où elle n'atteint guère 9%. Elle décroît régulièrement pour n'être plus que de 4% environ de la quantité théorique à p_H 10.

D'autre part, les chiffres du Tableau I montrent que, dans les conditions expérimentales réalisées, la production d'acétaldéhyde est proportionnelle à la quantité d'acide cystéine-sulfinique mise en jeu, et ce, quel que soit le p_H .

TABLEAU I
INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ACIDE CYSTÉINE-SULFINIQUE SUR LA QUANTITÉ D'ACÉTALDÉHYDE FORMÉE

Mêmes conditions expérimentales que dans les déterminations précédentes, sauf en ce qui concerne la concentration en acide cystéine-sulfinique.

p_H	Micromolécules d'acide aminé	Micromolécules d'acétaldéhyde formées	Mol. aldéhyde $\times 100$
			Mol. acide aminé
1	13.0	11.5*	88.5
	6.5	5.50	84.6
	3.25	2.81	86.5
2.4	13.0	10.1	77.7
	6.5	5.28	81.3
4.5	13.0	6.97	52.2
	6.5	3.15	48.5
5.5	13.0	2.25	17.3
	6.5	1.35	20.8

* Une ébullition de deux heures, au lieu de 75 minutes, à p_H 1, n'a pas modifié sensiblement la production d'acétaldéhyde.

La formation d'acétaldéhyde à partir des trois diacides aminés étudiés ici est évidemment l'indice de la rupture entre l'atome de carbone β et le groupement acide qu'il porte. Il n'est pas possible de dire avec certitude si cette rupture précède, accompagne ou suit la décarboxylation et la désamination qui portent sur le carbone α ; toutefois, d'après ce que l'on sait de l'action de la ninhydrine, il est probable que la rupture portant sur le carbone β se fait après les transformations subies par le carbone α . Quoi qu'il en soit, il apparaît dès maintenant que la labilité de la liaison C-S est considérablement plus grande dans l'acide cystéine-sulfinique que dans l'acide cystéique, ce qui correspond bien à la différence que manifestent ces deux acides dans leur comportement biologique¹, et est plus grande aussi que la liaison C-C correspondante de l'acide aspartique, dont on connaît la stabilité relative vis à vis de divers systèmes enzymatiques.

II. SÉPARATION ET DOSAGE SPÉCIFIQUE DE L'ALANINE ET DE L'ACIDE CYSTÉINE-SULFINIQUE PRIMITIVEMENT EN MÉLANGE

Les résultats précédents montrent qu'il est impossible de doser lalanine spécifiquement par la ninhydrine, en présence d'une quantité quelque peu importante d'acide

cystéine-sulfinique. La labilité de la liaison C-S de cet acide rendait d'autre part illusoire tout essai d'une autre méthode basée sur la production d'acétaldéhyde à partir de lalanine, et faisant intervenir, après la désamination des acides aminés par l'acide nitreux, l'oxydation des hydroxyacides correspondants soit par le permanganate⁸ soit par les ions cériques⁹. En outre, il nous est apparu qu'il n'était guère possible d'éliminer suffisamment l'acide cystéine-sulfinique en solution en présence d'alanine, par précipitation sous forme de sel de baryum en présence d'alcool: la chromatographie de partage sur papier d'après CONSDEN, GORDON ET MARTIN¹⁰ a montré, en effet, qu'il subsistait toujours dans le milieu des quantités notables d'acide cystéine-sulfinique après les diverses tentatives d'élimination poursuivies dans ce sens. Enfin, on pouvait espérer éliminer l'acide cystéine-sulfinique par un premier dosage à l'aide de permanganate de potassium, puis doser l'alanine restée apparemment intacte. Mais là encore, nous n'avons pas obtenu de résultat satisfaisant.

Aussi avons-nous étudié, pour le dosage de lalanine dans une solution contenant en même temps de l'acide cystéine-sulfinique, la possibilité de la séparation préalable de ce dernier par adsorption chromatographique sur alumine "acide", dont on connaît le pouvoir d'adsorption sélective des acides aminés dicarboxyliques.

Dans ce but, nous avons utilisé une colonne de 1 cm de diamètre constituée par 5 g d'alumine "acide", préparée d'après WIELAND¹¹ et lavée selon les indications de JUTISZ ET LEDERER¹².

L'étude de l'adsorption, puis de l'élation de l'acide cystéine-sulfinique seul a été faite dans les conditions suivantes: on fait passer sur la colonne adsorbante 3 ml d'une solution pouvant contenir jusqu'à 10 mg d'acide cystéine-sulfinique dans l'eau ou dans du bicarbonate de sodium à 0.16%; on lave ensuite avec 50 ml d'eau distillée. On recueille l'ensemble du filtrat dans lequel on dose l'acide cystéine-sulfinique qui aurait pu ne pas être retenu. La colonne est ensuite traitée par 15 ml d'une solution de NaOH 0.5 N puis par 15 ml d'une solution de NaOH 0.10 N. Ce traitement provoque l'élation de l'acide cystéine-sulfinique absorbé. On dose cet acide dans l'éluat. Le dosage de l'acide cystéine-sulfinique, aussi bien dans le filtrat que dans l'éluat, se fait après acidification franche du milieu par addition d'une à deux gouttes d'acide sulfurique concentré, au moyen d'une solution titrée de permanganate de potassium environ 0.018 M, selon la technique de SCHUBERT¹³.

D'autre part, nous avons vérifié que, dans ces conditions, lalanine seule se retrouve intégralement dans le filtrat: On fait passer sur la colonne d'alumine 3 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 0.16% contenant environ 500 µg d'alanine. On lave ensuite avec 50 ml d'eau distillée, et on recueille l'ensemble du filtrat qu'on amène à 10 ml après concentration sous vide. On prélève 1 ml de ce liquide dans lequel on dose lalanine par la méthode de ALEXANDER ET SELIGMAN⁴. Le fait que l'on y trouve pratiquement la totalité de lalanine initiale rend inutile la recherche de cet acide aniné dans un éluat qui eût été obtenu comme il a été dit à propos de l'acide cystéine-sulfinique.

D'autre part enfin, nous avons appliqué cette technique à un mélange d'acide cystéine-sulfinique et d'alanine, en opérant toujours sur 3 ml de solution. L'ensemble des résultats obtenus est donné dans le Tableau II.

Il apparaît ainsi qu'il est parfaitement possible de déterminer, avec une précision suffisante, la teneur d'une solution en alanine, même lorsque cette solution contient une quantité importante d'acide cystéine-sulfinique.

TABLEAU II
SÉPARATION ET DOSAGE DE L'ALANINE ET DE L'ACIDE CYSTÉINE-SULFINIQUE

Acide cystéine-sulfinique initial (mg)	Alanine initiale (μg)	Acide cystéine-sulfinique dans le filtrat (mg)	Acide cystéine-sulfinique dans l'éluat (mg)	Alanine dans le filtrat (μg)	Acide cystéine-sulfinique trouvé %	Alanine trouvée %
7.50	0	0.00	7.44	—	99.2	—
10.00	0	0.00	9.50	—	95.0	—
1.42	0	0.00	1.31	—	92.4	—
0	500	—	—	490	—	98.0
10.00	500	0.00	9.45	560	94.5	112
10.00	500	0.00	8.91	545	89.1	109
8.57	428	0.00	9.00	430	105	100

III. PRODUCTION ENZYMATIQUE D'ALANINE A PARTIR DE L'ACIDE L-CYSTÉINE-SULFINIQUE

Disposant ainsi d'une méthode analytique convenable, nous avons pu rechercher si la désulfination de l'acide L-cystéine-sulfinique par la désulfinitase est accompagnée de la production d'alanine.

La solution d'enzyme utilisée est obtenu de la façon suivante: 6 g de la poudre acétonique préparée à partir de foie de lapin² sont traités* pendant 30 min à 0° par 40 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 0.16%; après centrifugation, le résidu solide est remis en suspension dans 20 ml de la solution de bicarbonate, puis séparé à nouveau par centrifugation. Les liquides sont réunis et leur volume est complété à 60 ml avec la solution de bicarbonate. Un tel extrait enzymatique renferme environ 13 mg de matière sèche (non compris le bicarbonate), correspondant à 2 mg azote par ml.

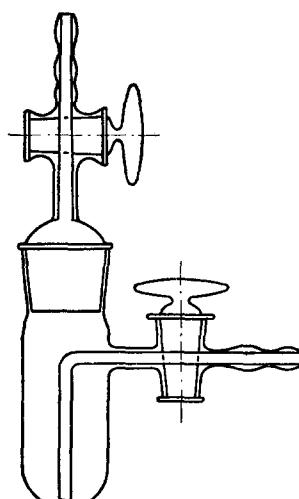


Fig. 2

Voici, à titre d'exemple, le détail d'une expérience: Cinq cellules de 30 ml environ de capacité (Fig. 2), numérotées de I à V, contiennent:

I et II: 10 ml d'extrait enzymatique, additionné de 25 mg d'acide cystéine-sulfinique et de 15 mg de bicarbonate de sodium.

III: 10 ml d'extrait enzymatique.

IV: 10 ml d'extrait enzymatique. Après son introduction dans la cellule, cet extrait est porté à l'ébullition pendant 1 min, puis, après refroidissement, est additionné de 20 mg d'acide cystéine-sulfinique et de 12 mg de bicarbonate de sodium.

V: 10 ml d'extrait enzymatique, porté à l'ébullition comme dans le cas précédent.

L'atmosphère surmontant le milieu réactionnel est constituée par de l'azote pur. Dans ces conditions, étant donné le léger dégagement de CO₂ à partir du bicarbonate qui se produit, le pH du milieu se stabilise aux environs de 7.5. Le tout est maintenu 2 heures à 38°.

Au bout de ce temps, on opère de la façon suivante: La cellule I est placée dans un bain à 0°; sous courant d'azote, on y préleve 4.0 ml. Cette prise est portée au bain-marie bouillant pendant 5 min pour coaguler la plus grande partie des protéines; on centrifuge, on lave le résidu avec un peu d'eau bouillante, on réunit les liquides de centrifugation et on complète leur volume à 7.5 ml. On soumet ces 7.5 ml à la chromatographie sur alumine

"acide", puis on élue par la soude diluée, dans les conditions indiquées plus haut. Le volume du filtrat est de 63 ml et celui de l'éluat de 32 ml.

* L'atmosphère surmontant la suspension en cours d'extraction peut être indifféremment de l'air, de l'azote ou un mélange azote + 5% anhydride carbonique.

Filtrat: On constate que le filtrat est pratiquement privé de toute substance capable de réduire le permanganate en milieu acide. On en préleve 1 ml pour le dosage de lalanine. Valeur trouvée 34 µg, soit, pour la totalité du liquide contenu dans la cellule I: $\frac{34 \cdot 63 \cdot 10}{4 \cdot 1} = 5.36$ mg.

Eluat: On préleve 10 ml de léluat pour le dosage de l'acide cystéine-sulfinique. Utilisant une solution de permanganate de potassium dont 0.31 ml correspond à 1.0 mg d'acide cystéine-sulfinique, on trouve 0.57 ml de cette solution, soit 1.84 mg d'acide cystéine-sulfinique; d'où, pour la totalité du liquide initialement contenu dans la cellule: $\frac{1.84 \cdot 10 \cdot 32}{4 \cdot 10} = 14.7$ mg.

Les 6 ml restés dans la cellule, toujours sous atmosphère d'azote, sont additionnés de 3 ml d'acide phosphorique concentré et d'une goutte d'alcool octylque; l'anhydride sulfureux libéré est déplacé par un courant d'azote, cette élimination étant facilitée par chauffage de la cellule aux environs de 60°. Il est recueilli dans 10 ml d'une solution de NaOH 0.1 N. Le titrage à l'iode, après acidification du milieu, donne 0.58 ml de thiosulfate 0.1 N correspondant à 1.85 mg de SO₂, soit pour la totalité du liquide: $\frac{1.85 \cdot 10}{6} = 3.10$ mg.

Les mêmes opérations sont faites sur le contenu des autres cellules; les résultats obtenus dans cette expérience sont donnés dans le Tableau III.

TABLEAU III
RÉSULTATS ANALYTIQUES D'UNE EXPÉRIENCE DE DÉSULFINATION ENZYMATIQUE DE L'ACIDE CYSTÉINE-SULFINIQUE

Cellule	Alanine totale (mg)	SO ₂ dosé (mg)	Substances réductrices exprimées en acide cystéine-sulfinique (mg)
I	5.36	3.10	14.7
II	5.34	3.39	14.1
III	1.42	0.51	4.6
IV	2.11	0.00	34.0
V	2.34	0.10	15.9

Les chiffres du Tableau III permettent de calculer:

1. Les quantités d'alanine apparue au cours de l'action enzymatique:

Cellule I: 5.36 — 1.42 = 3.94 mg = 44.3 µmol.

Cellule II: 5.34 — 1.42 = 3.92 mg = 44.0 µmol.

2. Les quantités d'anhydride sulfureux formé:

Cellule I: 3.10 — 0.51 = 2.59 mg = 38.9 µmol.

Cellule II: 3.39 — 0.51 = 2.88 mg = 45.0 µmol.

3. Les quantités d'acide cystéine-sulfinique disparu:

Cellule I: 25 — (14.7 — 4.6) = 14.9 mg = 97.5 µmol.

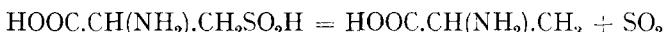
Cellule II: 25 — (14.1 — 4.6) = 15.5 mg = 101 µmol.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont groupés dans le Tableau IV.

TABLEAU IV
DÉSULFINATION ENZYMATIQUE DE L'ACIDE L-CYSTÉINE-SULFINIQUE

Alanine apparue (µmol)	SO ₂ apparu (µmol)	Alanine		Acide cystéine-sulfinique disparu (µmol)
		SO ₂	—	
44.3	38.9	1.14		97.5
44.0	45.0	0.98		101
30.9	25.6	1.20		97
25.8	26.8	0.96		107
		Moyenne: 1.07		

Il apparaît ainsi que, dans la limite des erreurs inhérentes au mode opératoire, il se forme bien une molécule d'alanine pour une molécule d'anhydride sulfureux dans la désulfination enzymatique de l'acide cystéine-sulfinique. Cette réaction peut donc s'écrire :



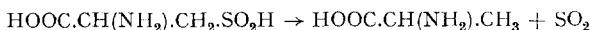
Il convient de remarquer en outre que la quantité d'acide cystéine-sulfinique qui disparaît est très notablement supérieure à celle qui correspond à l'équation précédente. Nous ignorons la nature de la réaction à laquelle participe l'acide aminé qui disparaît ainsi en excès.

RÉSUMÉ

1. L'acide cystéine-sulfinique est décomposé par la ninhydrine avec production d'acétaldehyde. Cette production qui, dans les conditions expérimentales réalisées ici, est de 86% de la quantité totale théoriquement possible, à pH 1, baisse avec la concentration en ions H, mais sans s'annuler; elle est encore de 17% à pH 5.5 auquel se fait le dosage de l'alanine dans la méthode de ALEXANDER ET SELIGMAN.

2. Il est donc impossible de doser l'alanine spécifiquement par la ninhydrine en présence d'une quantité quelque peu importante d'acide cystéine-sulfinique. Aussi une méthode a-t-elle été mise au point pour la séparation préalable de cet acide, permettant le dosage de l'alanine dans un mélange initial de ces deux acides aminés : l'acide cystéine-sulfinique est adsorbé sélectivement par de l'alumine, l'alanine est dosée par la ninhydrine.

3. L'utilisation de cette méthode à l'analyse de mélanges résultant de l'action de la désulfinase sur l'acide cystéine-sulfinique a montré que la libération d'une molécule d'anhydride sulfureux correspond à la production d'une molécule d'alanine. La réaction de désulfination enzymatique de l'acide cystéine-sulfinique est donc :

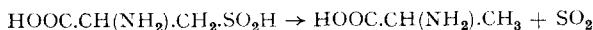


SUMMARY

1. Cysteine-sulphinic acid is decomposed by ninhydrin with production of acetaldehyde. Under the experimental conditions realised here, at pH 1, the yield of acetaldehyde is 86% of the theoretical, but it falls with decreasing hydrogen ion concentration, without ever actually vanishing. At pH 5.5, at which alanine is estimated by the method of ALEXANDER AND SELIGMAN, it still amounts to 17%.

2. It is therefore impossible to estimate alanine specifically by ninhydrin in the presence of even small quantities of cysteine-sulphinic acid. A method has been worked out, however, for the preliminary separation of this acid, which permits the estimation of alanine in a mixture of these two amino acids: cysteine-sulphinic acid is absorbed selectively by "acid" alumina, and is then extracted with soda and estimated by permanganate; the alanine is estimated by ninhydrin.

3. The use of this method in the analysis of mixtures resulting from the action of desulphinase on cysteine-sulphinic acid has shown that the liberation of one molecule of SO₂ corresponds to the formation of one molecule of alanine. The reaction in the enzymic desulphination of cysteine-sulphinic acid is therefore :



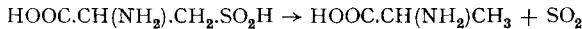
ZUSAMMENFASSUNG

1. Cysteinsulfinsäure wird durch Ninhydrin unter Acetaldehydbildung aufgespalten. Die Acetaldehydbildung beträgt unter den hier realisierten experimentellen Bedingungen bei pH 1 86% der theoretisch möglichen Menge; sie wird mit abnehmender Wasserstoffionenkonzentration geringer, ohne jedoch zu verschwinden. Bei pH 5.5, bei dem die Alaninbestimmung nach ALEXANDER UND SELIGMAN ausgeführt wird, beträgt sie noch 17%.

2. Es ist also unmöglich, um Alanin spezifisch mit Ninhydrin zu bestimmen, sogar wenn nur geringe Mengen Cysteinsulfinsäure vorhanden sind. Deshalb wurde eine Methode ausgearbeitet, um diese Säure vorher abzutrennen; diese Methode ermöglicht die Alaninbestimmung in einem Gemisch

dieser beiden Aminosäuren: Cysteinsulfinsäure wird durch "saures" Aluminiumhydroxyd selektiv absorbiert, danach mit Soda eluiert und mit Permanganat bestimmt; Alanin wird mit Ninhydrin bestimmt.

3. Die Anwendung dieser Methode auf die Analyse von Mischungen, die durch die Einwirkung der Desulfinicase auf Cysteinsulfinsäure entstehen hat gezeigt, dass die Freisetzung eines Moleküls SO_2 mit der Bildung eines Moleküls Alanin übereinstimmt. Die Reaktion der enzymatischen Desulfurierung von Cysteinsulfinsäure ist also:



BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. FROMAGEOT, *Advances in Enzymology*, 7 (1947) 369.
- ² C. FROMAGEOT ET F. CHATAGNER, *C. R. Acad. Sc.*, 224 (1947) 367.
- ³ C. L. A. SCHMIDT ET G. W. CLARK, *J. biol. Chem.*, 53 (1922) 193.
- ⁴ B. ALEXANDER ET G. SELIGMAN, *J. biol. Chem.*, 159 (1945) 9.
- ⁵ T. F. LAVINE, *J. biol. Chem.*, 113 (1936) 580.
- ⁶ E. FRIEDMANN, *Beiträge zur chem. Physiol. u. Path.*, 3 (1902) 1.
- ⁷ D. D. VAN SLYKE, R. T. DILLON, D. A. McFADYEN ET P. HAMILTON, *J. biol. Chem.*, 141 (1941) 627.
- ⁸ C. FROMAGEOT ET P. HEITZ, *Microchim. Acta*, 3, (1938) 52.
- ⁹ R. J. D. BOLLING ET M. WEBB, *J. biol. Chem.*, 133 (1940) XIV.
- ¹⁰ R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
- ¹¹ T. WIELAND, *Z. physiol. Chem.*, 273 (1942) 24.
- ¹² M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Médecine et Biologie*, 5 (1947) 229.
- ¹³ M. P. SCHUBERT, *J. am. chem. Soc.*, 55 (1933) 3336.

Reçu le 15 mai 1948