

approximately of the same magnitude, whatever the proteolytic enzyme used.

Furthermore, we observed that pyridoxine and other derivatives afford no protection of cystathionase against proteolysis, and that inclusion of 3 μ g of trypsin (or chymotrypsin or pronase) in the assay of a non-incubated enzyme resulted in a slight fall of activity (approximately 10–15%).

The evidence at present available indicates that, for both enzymes, chymotrypsin is the most efficient among the physiological proteolytic enzymes.

Addition of pyridoxal phosphate is without effect on the inactivation of CSA decarboxylase, whereas the digestion of cystathionase is decreased when the incubations were carried out in presence of pyridoxal phosphate. Finally, we have also observed that with regard to this protection, pyridoxal phosphate is specific. It must be kept in mind that CSA decarboxylase was obtained as holoenzyme, whereas cystathionase was available as apoenzyme. It is therefore tempting to speculate that the molecular conformation of cystathionase is modified whether the enzyme exists in the form of apoenzyme or in the form of holoenzyme, and that apocystathionase is more susceptible to inactivation by proteolytic enzymes than holo-cystathionase.

Conformational changes in enzymic proteins leading to modified susceptibility to proteolysis have already been achieved for other enzymes⁷⁻⁹.

Anyway these results clearly suggest that the level of PLP in the liver has a role in imparting stability of cystathionase in this tissue. Secondly, as cystathionase is more susceptible to thermal denaturation when DTT was not included in the incubated mixture during the assay, this finding suggests that the integrity of some

sulphydryl groups contribute to the stability of the enzyme.

On the other hand, PLP partially protects CSA decarboxylase against heat denaturation and thermal inactivation^{1,2} whereas it is ineffective against proteolysis. Whatever the reason for the different behaviour of PLP in the 2 situations, it seems of interest to emphasize this fact, for the explanation of which more research is needed.

Résumé. Les résultats obtenus lors de l'étude de la protéolyse, par la trypsine, l' α -chymotrypsine et la pronase, de préparations partiellement purifiées de cystathionase et de décarboxylase de l'acide cystéine sulfinique sont décrits. Il apparaît que, pour la cystathionase, la sensibilité à la protéolyse est différente selon que l'on utilise l'apoenzyme ou l'holoenzyme.

FERNANDE CHATAGNER, YVELINE GICQUEL,
CHRISTIANE PORTEMER and MICHÈLE TIXIER

Laboratoire de Chimie Biologique,
96 bd Raspail,
F-75 Paris 6^e (France), 29 September 1969.

⁷ R. T. SCHIMKE, E. W. SWEENEY and C. M. BERLIN, *J. biol. Chem.* **240**, 4609 (1965).

⁸ P. S. FITT and E. A. FITT, *Biochem. J.* **105**, 27 (1967).

⁹ D. K. MCCLINTOCK and G. MARKUS, *J. biol. Chem.* **243**, 2855 (1968).

¹⁰ Acknowledgement. The authors wish to thank C.N.R.S. for financial support (Equipe de Recherches No. 43).

Einfluss des Schwefeldioxids auf den Gehalt freier Saccharide und Aminosäuren in Erbsen-Keimpflanzen

Der Mechanismus von toxischen Einwirkungen des Schwefeldioxids auf die Pflanzen wurde noch nicht völlig geklärt, obwohl dieses Problem schon in vielen Studien bearbeitet wurde¹⁻¹². In manchen Arbeiten wurde der Einfluss des SO₂ auf den Stoffwechsel der Saccharide und die Photosynthese erwähnt³⁻¹¹. Es kommt zu einer Verminderung der Konzentration der Saccharide, wobei besonders die Konzentration der Saccharose abfällt^{5,7} und die Stärke hydrolytisch zersetzt wird¹¹. Ausserdem wurden in den mit SO₂ vergifteten Pflanzen auch Störungen des Aminosäurestoffwechsels beobachtet und es zeigte sich eine Verminderung des Glutaminsäure-Gehalts⁷.

In Rahmen unserer Versuche über die biochemischen Grundlagen der SO₂-Toxizität bei Pflanzen benutzten wir Erbsenkeimlinge, also Pflanzen mit intensiv verlaufendem Metabolismus, bei denen die Empfindlichkeit gegen toxische Einwirkung des SO₂ gross ist. Die Intoxikation mit SO₂ wurde bei grünen sowie etiolierten Keimlingen durchgeführt, um abzuklären, ob SO₂ den Saccharidstoffwechsel via Photosynthese wirklich stört. Die Veränderungen des Saccharidgehalts und der freien Aminosäuren in den vergifteten Erbsenkeimpflanzen werden diskutiert.

Wir benutzten 14–15tägige Erbsenkeimpflanzen, die bei Licht oder Dunkelheit auf mit destilliertem Wasser befeuchtetem Filtrierpapier kultiviert wurden. Die Intoxikation der Keimpflanzen mit SO₂ wurde in grösseren Erlenmeyer-Kolben (2000 cm³), die mit Schliffverschluss

versehen waren, durchgeführt. Die Keimpflanzen wurden auf feuchtes Filtrierpapier auf den Boden des Kolbens gegeben und die nötige 1% Atmosphäre mittels Zersetzung von festem Na₂SO₃ mit 20% Schwefelsäure in kleiner Glasschale hergestellt. Die Einwirkung des SO₂ dauerte bei Licht und Dunkelheit 24, 48, 72 und 96 h. Die Kontrollpflanzen ohne SO₂ waren während derselben Zeit in gleichen Gefässen an der Luft. Nach Beendigung der gewählten Intoxikationszeit wurden die Versuchs-

¹ M. KATZ, *Ind. Engng. Chem.* **41**, 2450 (1949).

² M. D. THOMAS, *A. Rev. Pl. Physiol.* **2**, 293 (1951).

³ M. D. THOMAS und G. R. HILL, *Pl. Physiol.* **10**, 291 (1935); **12**, 309 (1937).

⁴ M. VOGL, S. BÖRTITZ und H. POLSTER, *Arch. Forstw.* **13**, 1031 (1964).

⁵ I. SPÁLENÝ, F. GODIN und B. MAŘAN, 5th Int. Congr. Biochem., Moscow 1961, Abstr. Commun. 333.

⁶ M. VOGL, *Biol. Zbl.* **83**, 587 (1964).

⁷ S. BÖRTITZ, *Biol. Zbl.* **83**, 501 (1964).

⁸ P. R. MILLER, F. W. COBB JR. und E. ZAVARIU, *Hilgardia* **39**, 135 (1968).

⁹ H. W. DE KONING und Z. JEGIER, *Atmos. Environ.* **2**, 321 (1968).

¹⁰ V. S. NIKOLAJEVSKIJ, *Fiziologiya Rast.* **15**, 110 (1968).

¹¹ S. BÖRTITZ, *Biol. Zbl.* **87**, 63 (1968).

¹² E. HASELHOFF und G. LINDAU, *Die Beschädigung der Vegetation durch Rauch* (G. Bornträger, Berlin 1903).

pflanzen auf Kotyledonen, Wurzeln und Achsen verteilt und diese Organe (je 5 g) getrennt zweimal mit 70% Äthylalkohol extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden bei 40°C im Vakuum im Wasserbad eingedampft und dann auf gleiches Volumen (3 ml) mit 70% Äthylalkohol gebracht. Die konzentrierten Extrakte wurden zur papierchromatographischen Analyse der Saccharide und Aminosäuren benutzt^{13,14}. Die semiquantitative Auswertung der Chromatogramme geschah mittels visueller Abschätzung der Fläche und Intensität der Zucker- sowie Aminosäuren-Flecke nach der Sichtbarmachung mittels entsprechendem Reagenz.

In den mit SO₂ vergifteten Erbsenkeimlingen wurde in allen Fällen eine wesentliche Verminderung der Saccharosekonzentration und meistens eine merkwürdige Erhöhung des Glukose- und besonders Fruktosegehalts in Wurzeln und Achsen gefunden, insbesondere bei etiolierten Keimpflanzen. In den Kotyledonen dagegen konnten in den meisten Fällen keine bemerkenswerten Veränderungen des Saccharidgehaltes festgestellt werden. Weil die erwähnten Veränderungen nicht nur bei grünen, sondern auch bei etiolierten Keimpflanzen beobachtet wurden, kann es sich nicht ausschliesslich um eine Störung der Photosynthese handeln. Ebenso kann es sich nicht um eine blosse Hydrolyse der Saccharose mittels SO₂ im wässrigen Milieu der Pflanzengewebe handeln, weil im Modellversuch mit einer 10%igen Saccharoselösung in der Atmosphäre des 1% SO₂ papierchromatographisch nur eine schwache hydrolytische Spaltung der Saccharose festgestellt wurde. Unsere Befunde zeigen eine Störung der Saccharose-Biosynthese in den vergifteten Keimpflanzen. Der Mechanismus dieser Störung ist noch nicht bekannt und es muss darüber weiter geforscht werden.

In grünen Keimpflanzen, die bei Licht oder Dunkelheit mit SO₂ vergiftet wurden, waren der Alanin und Methioninsulfoxidgehalt erhöht, während die Konzentration der Glutaminsäure in allen 3 Organen, besonders in Wurzeln und Achsen, wesentlich geringer war. Bei etiolierten Keimpflanzen, deren Intoxikation bei Dunkel-

heit oder bei Licht verlief, wurde in allen 3 Organen bei Erhöhung des Alaningehalts ein geringerer Glutaminsäuregehalt festgestellt. In Wurzeln und Achsen war auch die Konzentration der γ -Aminobuttersäure vermehrt. Dieser Befund kann auf Grund der erhöhten Glutaminsäure-Dekarboxylierung, die zur γ -Aminobuttersäure führt, erklärt werden. Die mit SO₂ vergifteten grünen Keimpflanzen hatten in Wurzeln und Achsen einen geringeren Glutamingehalt, während in Kotyledonen und Wurzeln der Serin- und Homoserinegehalt kaum vermindert war. Der Eingriff des SO₂ in den Saccharidstoffwechsel bewirkt demnach Veränderungen des Gehalts besonders derjenigen Aminosäuren, deren Stoffwechsel mit demjenigen der Saccharide eng verbunden ist. Weitere Versuche über den Mechanismus der Einwirkung des SO₂ auf den Aminosäurestoffwechsel sind im Gange.

Summary. The influence of gaseous 1% sulphur dioxide during 24, 48, 72 and 96 h on saccharide and amino acid content, has been studied on 14–15-day old green and etiolated pea seedlings. In roots and shoots of intoxicated seedlings of both sorts, there was found a marked decrease of sucrose and a marked increase of glucose and fructose content, most probably as a consequence of disturbed sucrose biosynthesis. In cotyledons, roots and shoots there was also found an increase of alanine and a decrease of glutamic acid content.

J. KOŠTÍŘ, I. MACHÁČKOVÁ,
V. JIRÁČEK and E. BUCHAR

Biochemisches Institut der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Karls-Universität,
Praha 2 (Tschechoslowakei), 17 November 1969.

¹³ V. JIRÁČEK, J. SÜSS und J. KOCOUŘEK, *Planta med.* 10, 298 (1962).

¹⁴ V. JIRÁČEK, *J. Chromat.* 33, 312 (1968).

Wall Development and Tetrazolium Chloride Reduction in Heterocysts of Blue-Green Algae, *Anabaena ambigua*

Blue-green algae like *Anabaena* reduce 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) even without the addition of external hydrogen donors like succinate¹⁻³. It is of special interest that the activity in the heterocysts is always high as shown by less time taken for the formation of formazon crystals in them compared with the vegetative cells. In *Anabaena ambigua* we found that unlike in other blue-green algae, the activity of TTC-reductase appeared to be extremely low or even absent in the vegetative cells, whereas in the heterocysts it was very high. Big formazon crystals indicating the TTC reduction appeared within a few minutes. The activity in the vegetative cells could, however, be enhanced several times if the filaments were incubated with succinate for several hours in the presence of light⁴.

In the light of the recent work by STEWART et al.⁵, the TTC-reductase activity of the heterocysts appears to be due to the nitrogenase present in them. During our studies on the physiology of the development of heterocysts and its control, we^{6,7} showed that the presence of wall is essential for such reduction. Proheterocysts⁸ have

no cellulose wall and they behave more like the vegetative cells in the matter of TTC reduction. They attain the capacity to reduce TTC only after they develop a thick cellulose wall (Figure). We may infer that enzymes concerned with nitrogen fixation are induced in a proheterocyst only after the wall is laid down. The wall is evidently needed to protect the reductases concerned with reduction of nitrogen. Mature heterocysts do not produce

¹ H. DRAWERT and I. TISCHER, *Naturwissenschaften* 43, 132 (1956).

² E. R. S. TALPASAYI, *Proc. Summer School in exp. Bot.*, Ooty (1965).

³ E. R. S. TALPASAYI, *Curr. Sci.* 36, 190 (1967).

⁴ S. R. KALE, *Phykos* 8, in press (1969).

⁵ W. D. P. STEWART, A. HAYSTEAD and H. W. PEARSON, *Nature* 224, 226 (1969).

⁶ S. R. KALE, Ph.D. thesis (1969).

⁷ M. R. BAHAL, Ph.D. thesis (1969).

⁸ S. KALE and E. R. S. TALPASAYI, *R. Misra Commemoration Volume* (B.H.U. Botanical Society, Varanasi 1967), p. 48.