

Kurze Mitteilungen

Bis am 15. des Monats bei der Redaktion eingehende Kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht. Es werden auch Manuskripte aus dem Ausland angenommen

Enzymatische Acylierung von Sterin-¹⁴C-Glucosid durch ein lösliches Enzym aus Karotten*

Summary

A soluble enzyme preparation from homogenized carrots (*Daucus carota* L.) catalyzes the formation of acylated steryl ¹⁴C-glucoside from steryl ¹⁴C-glucoside when either mono- or digalactosyl diglyceride is supplied as acyl donor. The soluble enzyme from carrots is suggested to be different from the one found in green leaves by HEINZ, which catalyzes the formation of acylgalactosyl diglyceride from monogalactosyl diglyceride.

Die in Pflanzen verbreiteten Acyl-Steringlykoside (Acyl-sG) werden auf enzymatischem Wege durch Übertragung einer Acyl-Gruppe auf den Zuckerrest von Steringlykosid (sG) gebildet¹. Die Reaktion wird *in vitro* durch Partikelfractionen katalysiert, die aus Sojasamen², grünen Blättern^{3,4}, Bohnenkeimlingen⁵, Blumenkohl, Erbsenwurzeln und Avocado-Mesocarp⁶ gewonnen werden können, woraus zu schließen ist, daß die entsprechende Acyltransferase strukturgebunden ist. Da, wie unsere Versuche gezeigt haben, auch mehrmals ausgewaschene Partikel ohne Zugabe eines exogenen Acyl-Donors diese Acylierung durchführen, muß die übertragene Fettsäure aus strukturgebundenen endogenen Acyl-Donoren stammen. Als solche kommen vor allem die in diesen Partikelfractionen reichlich vorhandenen Phospho- und Galaktolipide in Frage, welche theoretisch zwei Fettsäuren pro Mol abgeben können. Da auch pflanzliche Speicherorgane Acyl-sG enthalten⁷⁻⁹ und daher eine entsprechende Acyltransferase besitzen müssen, haben wir weitere Versuche mit solchen durchgeführt. Dabei konnten wir beobachten, daß ¹⁴C-Glucose-markiertes Steringlykosid (¹⁴sG) in Gegenwart von Galaktolipiden durch eine lösliche Proteinfraction aus Karotten in Acyl-Sterin-¹⁴C-Glucosid (Acyl-¹⁴sG) umgewandelt wird.

Als Acyl-Donoren wurden Galaktolipide verwendet, weil diese in grünem Pflanzenmaterial besonders leicht zugänglich sind. Zur Isolierung wurden Lipide aus Spinatblättern auf Kieselgel-G-Platten aufgetragen und

diese zur Gewinnung von Monogalaktosyldiglycerid (MGG) in Chloroform-Methanol 6 : 1, zur Gewinnung von Digalaktosyldiglycerid (DGG) in Chloroform-Methanol-Wasser 75 : 25 : 1¹⁰ entwickelt.

Zur Herstellung des löslichen Enzympräparates aus Karotten wurden diese bei 0 bis 5°C mit der gleichen Menge Tris-Puffer (0,1 M, pH 8,2) in einem Bühler-Homogenisator (Edmund Bühler, Tübingen) fein zerkleinert und durch ein grobporiges Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wurde während 60 min bei 100 000 g (Beckman Spinco L2, SW 50-Rotor) zentrifugiert und der Überstand direkt für Versuch 1 verwendet.

In Versuch 1 wurden ¹⁴sG und MGG in 40 µl Dimethylsulfoxid und 50 µl Triton X-100 5% suspendiert und mit 300 µl Überstand während 17 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Produkte wurden unter Zusatz von Blattlipiden als Carrier mit Chloroform-Methanol 2 : 1 und Äther extrahiert und auf Kieselgel-G-Platten mit Chloroform-Methanol 6 : 1 chromatographiert¹. Die Identifizierung des gebildeten Acyl-¹⁴sG erfolgte durch R_f-Wert und Rückführung in ¹⁴sG durch alkalische Hydrolyse¹. Die Resultate, die in Tabelle 1 dargestellt sind, zeigen, daß dieser Überstand eine lösliche Acyltransferase enthält. Bei vorheriger Hitzeinaktivierung (2 min 100°C) wird kein Acyl-sG gebildet. Wir haben versucht, das lösliche Enzym durch Ammoniumsulfatfällung anzureichern. Zu diesem Zweck wurde der Überstand stufenweise mit Ammoniumsulfat versetzt. Ein erster, bei Zusatz von 21 g pro 100 ml erhaltener Niederschlag (Fraktion I) wurde verworfen. Die bei Zusatz weiterer 21 g pro 100 ml erhaltene Fällung (Fraktion II) wurde abzentrifugiert, in wenig destilliertem Wasser aufgenommen und direkt für Versuch 2 verwendet. In diesem sollte die Abhängigkeit der Reaktion vom Acyl-Donor gezeigt werden.

¹⁴sG und Acyl-Donor wurden in 20 µl Dimethylsulfoxid und 20 µl Triton X-100 5% suspendiert und mit 100 µl Enzymlösung (0,8 mg Protein) und 100 µl Tris-Puffer (0,1 M, pH 8,2) 4 Stunden bei 30°C inkubiert. Wie aus den Ergebnissen, die in Tabelle 1 dargestellt sind, hervorgeht, unterbleibt die Reaktion, wenn kein Galaktolipid (MGG oder DGG) zugesetzt wird. Daraus ist zu schließen, daß die übertragene Acyl-Gruppe aus diesen Lipiden stammt, wobei DGG als Acyl-Donor wirksamer ist als MGG.

Einen anderen, dieser Acylierung von Steringlykosid sehr ähnlichen Vorgang hat HEINZ in Spinatblättern

* Eingegangen am 15. Oktober 1970.

¹ W. EICHENBERGER und E. C. GROB, *Chimia* 23 (1969) 368.

² C. T. HOU, Y. UMEMURA, M. NAKAMURA und S. FUNAHASHI, *J. Biol. Chem. [Tokyo]* 62 (1967) 389, 63 (1968) 351.

³ W. EICHENBERGER und E. C. GROB, *Chimia* 22 (1968) 46.

⁴ W. EICHENBERGER und D. W. NEWMAN, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 32 (1968) 366.

⁵ H. KAUSS, *Z. Naturforsch.* 23b (1968) 1522.

⁶ A. ONGUN und J. B. MUDD, *Plant Physiol.* 45 (1970) 255.

⁷ W. EICHENBERGER und E. C. GROB, *FEBS Letters*, im Druck.

⁸ M. LEPAGE, *J. Lipid Res.* 5 (1964) 587; *Lipids* 3 (1968) 477.

⁹ T. GALLIARD, *Phytochemistry* 7 (1968) 1907, 7 (1968) 1915.

Tabelle 1. Einbau von glucose-markiertem Steringlucosid ($^{14}\text{S G}$) in Acyl-Sterin- ^{14}C -Glucosid (Acyl- $^{14}\text{S G}$) durch lösliche Proteinfraktionen aus Karotten

Versuch	Enzympräparat	$^{14}\text{S G}$ eingesetzt		Acyl-Donor		Acyl- $^{14}\text{S G}$ gebildet		
		cpm	μM		μM	cpm	% eingebaut	nM
1	Überstand	7500*	0,13	MGG	0,6	472	6,3	8
	do. inaktiv	7500	0,13	MGG	0,6	0	0	0
2	Fraktion II	4000	0,07	DGG	1,0	1219	30	20
	do.	4000	0,07	—	—	45	1,1	0,7
	do.	3000	0,05	MGG	1,0	327	11	5,5
	do. inaktiv	4000	0,07	DGG	1,0	0	0	0

* Alle Radioaktivitätsmessungen wurden mit einem Gas Flow Counter (Nuclear Chicago) durchgeführt (Zählensbeute 29%).

Tabelle 2. Einbau von $^{14}\text{S G}$ in Acyl- $^{14}\text{S G}$ und von ^{14}MGG in Acyl- ^{14}MGG * durch lösliche Enzympräparate aus Karotten und Spinatblättern

Enzympräparat (Überstand)	$^{14}\text{S G}$ eingesetzt		^{14}MGG eingesetzt		Acyl-Donor		Acyl- $^{14}\text{S G}$ gebildet			Acyl- ^{14}MGG gebildet		
	cpm	μM	cpm	μM		μM	cpm	%	nM	cpm	%	nM
<i>Karotte</i>												
aktiv	18400	0,28	—	—	DGG	1,9	852	4,6	13	—	—	—
inaktiv	18400	0,28	—	—	DGG	1,9	0	0	0	—	—	—
aktiv	—	—	7800	0,31	DGG	1,9	—	—	—	60	0,8	2,4
inaktiv	—	—	7800	0,31	DGG	1,9	—	—	—	15	0,2	0,6
<i>Spinatblätter</i>												
aktiv	18400	0,28	—	—	DGG	1,9	8	0,04	0,12	—	—	—
inaktiv	18400	0,28	—	—	DGG	1,9	0	0	0	—	—	—
aktiv	—	—	7800	0,31	DGG	1,9	—	—	—	66	0,85	2,6
inaktiv	—	—	7800	0,31	DGG	1,9	—	—	—	21	0,3	0,8

* Die mögliche Übertragung von Acyl-Resten von ^{14}MGG auf dieses selbst wurde vernachlässigt.

entdeckt und untersucht¹⁰. Bei diesem überträgt ein lösliches Enzym eine Acyl-Gruppe von verschiedenen Lipiden (vorzugsweise DGG) auf den Zuckerrest von MGG unter Bildung von Acyl-Monogalaktosyldiglycerid (Acyl-MGG). Ob dieses Enzym auch SG zu acylieren vermag, wurde dort nicht untersucht.

In den beiden erwähnten Acylierungen wird der Acyl-Rest auf eine Hexose übertragen, welche im einen Fall mit einem Sterin, im andern Fall mit einem Diglycerid verknüpft ist. Als Acyl-Donoren dienen in beiden Fällen die gleichen Lipide. Daher stellte sich die Frage, ob nicht die zwei Enzyme beide Reaktionen katalysieren können und damit identisch sind.

In Versuch 3 wurden daher zum Vergleich beide Enzympräparate unter denselben Bedingungen während 8 Stunden mit zwei Substratgemischen inkubiert. Diese enthielten neben DGG (als Acyl-Donor) im einen Fall $^{14}\text{S G}$ und im anderen Fall ^{14}MGG , welches aus *Chlorella*-Kulturen gewonnen wurde, welche mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetat gefüttert wurden. Als Enzympräparate wurden die Überstände verwendet, die durch Homogenisieren von Spinatblättern und Karotten und nachfolgende Zentrifugation, wie oben beschrieben, gewonnen wurden. Die

extrahierten Produkte wurden unter Zusatz von Acyl-SG aus Lattichblättern und Acyl-MGG aus homogenisierten Spinatblättern¹⁰ auf Kieselgel G mit Äther (wassergesättigt) – Isopropanol – Wasser 100 : 4,5 : 3¹⁰ chromatographiert und die Flecke mit Ioddampf sichtbar gemacht, mit Aceton eluiert und gemessen.

Die Ergebnisse, die in Tabelle 2 zusammengestellt sind, zeigen, daß die Acyltransferase aus Karotten SG in weit höherem Maße acyliert als MGG. Die Acyltransferase aus Spinatblättern dagegen überträgt unter denselben Bedingungen Acyl-Reste bevorzugt auf MGG und nur zu einem geringen Teil auf SG. Dieser ausgeprägte Unterschied in der Substratspezifität läßt den Schluß zu, daß zwei verschiedene Enzyme vorliegen.

Wahrscheinlich unterscheiden sich diese auch im pH-Optimum. Vorläufige Ergebnisse deuten nämlich darauf hin, daß das Optimum der Acyltransferase aus Karotten im alkalischen Gebiet liegt, während für dasjenige der Acyltransferase aus Spinatblättern ein pH von 4,6 angegeben wird¹⁰. Daraus erklärt sich auch die geringe Aktivität dieses Enzyms unter unseren Versuchsbedingungen (pH 8,2).

Aus den Versuchen von HEINZ ging ferner hervor, daß bei der Acylierung von MGG durch die lösliche Acyltransferase aus Spinatblättern beide Fettsäuren vom Acyl-

¹⁰ E. HEINZ, *Biochim. Biophys. Acta* 144 (1967) 321, 333.

Donor abgespalten werden¹⁰. Ob dies auch bei der Acylierung von SC durch das Enzym aus Karotten der Fall ist, läßt sich zur Zeit nicht entscheiden.

Nach unseren bisherigen Befunden müssen Pflanzen eine lösliche und eine partikelgebundene Acyltransferase enthalten. Beide vermögen Acyl-Stringlykoside zu bilden. In welcher Beziehung sich die beiden Enzyme unterscheiden, kann erst aufgrund ihrer eingehenden Charakterisierung und weiterer Versuche über den Reaktionsverlauf und die Natur der Produkte entschieden werden.

Ferner gilt es abzuklären, ob die beiden Enzyme in der Pflanzenzelle nebeneinander vorkommen und wie sie im pflanzlichen Organismus verteilt sind.

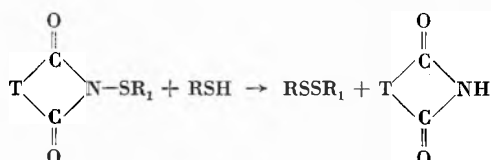
Die Arbeiten wurden mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds durchgeführt.

W. EICHENBERGER und E. C. GROB

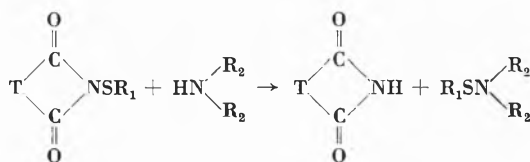
Institut für organische Chemie der Universität Bern,
3012 Bern, Länggäßstraße 7

Chemistry of Sulfur Compounds, VII¹: A Novel Method for the Preparation of *n*-Thio-Secondary Amines*

Recently we have reported a novel method for the preparation of disulfides by reacting a thiol with a sulfenamide derived from an imide such as phthalimide, succinimide or maleimide¹. The general reaction was depicted as follows:

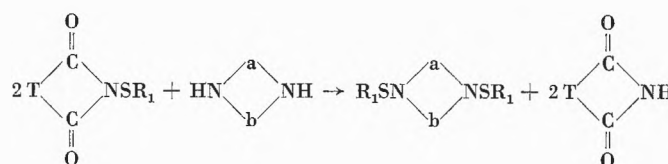


T = (CH₂)₂, *o*-C₆H₄ or (HC=CH) and R ≠ R₁ = alkyl, cycloalkyl, aryl or aryl-alkyl. We wish to describe now a new method of preparing thioamines of the general formula $\text{R}_1\text{SN} \begin{array}{l} \text{R}_2 \\ \diagup \\ \diagdown \end{array}$ where R₁ is an alkyl, cycloalkyl, aryl or aryl-alkyl and R₂ is an alkyl or an alkylene. Thioamines are produced by reacting a sulfonyl chloride with the amines in presence of an acid acceptor². They are now obtainable highly pure and in high yield, by reacting a secondary amine with a thio imide under mild reaction conditions with no catalyst. The general reaction can be depicted as follows:



The compounds prepared by this method include those where T is *o*-C₆H₄ and (CH₂)₂.

If the amine contains two NH groups the scheme is:



Piperazine, homopiperazine and 4,4' trimethylene dipiperidine are representatives of this class.

The reaction may be conducted at a temperature between 20 and 100°C in presence of an inert solvent, in which the by-product is insoluble. Alcohol, such as isopropanol, was used when necessary to dissolve the starting amine. Some of the thioamines obtained by the above described novel method are listed in table I.

The yield is quantitative based on the recovered imides. The reaction was run at 90°C for 4 to 6 hrs. as described in the procedure below. It requires a longer time (72 hrs.) to completion at room temperature in benzene.

Experimental Section

General Procedure: Di-*n*-hexylamine (37.0 g, 0.2 mole) is added at 90°C to N-cyclohexylthiophthalimide³ (52.0 g, 0.2 mole) dissolved in 400 ml of heptane and the mixture stirred for six hours, then cooled. The phthalimide (29.0 g, yield 100%) is recovered by filtration and N-cyclohexylthiodi-*n*-hexylamine **6** was isolated after evaporation of the filtrate and the structure confirmed by nmr (yield 58.0 g, 96%). Anal. calculated for C₁₈H₃₇NS: N 4.67; S 10.70. Found: N 4.75; S 10.91.

Compounds **1** to **15** were obtained from the corresponding thiophthalimide and amine while Compound **16** was obtained from the corresponding N-thio-succinimide and morpholine. N-(isobutylthio)morpholine was also obtained from N-(isobutylthio)phthalimide and morpholine and its structure identified by nmr.

Acknowledgment: The author wishes to thank L. SWANEY for his help in preparing the manuscript.


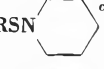
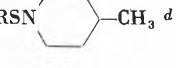
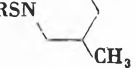
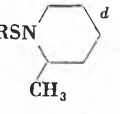
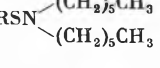
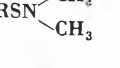
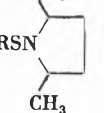
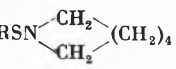
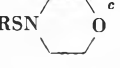
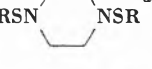
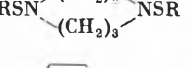
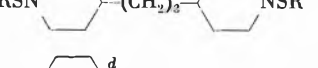
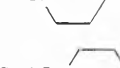
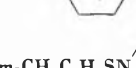

³ M. BEHNEFEROUZ and J. E. KERWOOD, *J. Org. Chem.* 34 (1969) 51.

* Received October 19, 1970.

¹ Part VI: K. BOUSTANY and A. SULLIVAN, accepted for publication in *Tetrahedron Letters*.

² E. MÜLLER and E. W. SCHMIDT, *Chem. Ber.* 96 (1963) 3059. Thioamines were not obtained when chloroamines were reacted with mercaptane in ethereal solution, cf. H. H. SISLER *et al.*, *J. Org. Chem.* 35 (1970) 1742.

Table I. Thioamines^a prepared *via* amines and sulfenimides

Compound ^b	Mp or bp (mm), °C	Calculated, %		Found, %	
		S	N	S	N
1 	70-74.5 (0.5)	17.3	7.55	17.2	7.52
2 	83-88 (0.5)	16.0	7.05	15.51	7.01
3 	86-92 (0.5)	15.01	6.56	15.02	6.46
4 	86-90 (0.5)	15.0	6.56	15.2	6.4
5 	106 (1.5)	15.0	6.56	15.1	6.58
6 	oil	10.7	4.67	10.9	4.75
7 	38-40 (0.3)	20.0	8.80	20.0	8.90
8 	-	15.0	6.56	14.95	5.96
9 	-	15.0	6.56	15.45	6.33
10 	128 (8)	15.93	6.95	15.33	6.62
11 	74-75	20.3	8.9	20.3	8.9
12 	42	19.5	8.53	19.37	8.52
13 	38	14.3	6.38	14.6	6.25
14 	117 (1.0)	14.1	6.08	14.1	6.20
15 	31.5-33	-	-	-	-
16 	-	15.3	6.69	15.5	6.54

^a All compounds were also identified by nmr,^b R = cyclohexyl, R' = cyclooctyl,^c described in litt. ²,^d the C and H microanalyses were within acceptable limits.

KAMEL BOUSTANY

Monsanto Co., Organic Chemicals Division,
Rubber Chemicals Research Laboratories,
Akron (Ohio) 44313