

# EPILENTINSÄURE, EIN NEUER AROMA- UND GERUCHS-PRECURSOR IN TRICHOLOMA ARTEN

ROLF GMELIN,\* MÉDARD N'GALAMULUME-TREVES\* und GERHARD HÖFLE†

\*Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der Freien Universität Berlin, Königin-Luise Straße, D-1000 Berlin 31, W. Germany; †Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig-Stöckheim, W. Germany

(Eingegangen am 8 Mai 1979)

**Key Word Index**—*Micromphale foetidum*; *M. cauetii*; *Collybia impudica*; Tricholomataceae;  $\gamma$ -glutamylcysteine sulfoxides; enzymatic degradation.

**Abstract**—The investigation of three further *Tricholoma* species afforded in addition to lentinic acid a diastereomer epilentinic acid. The structure was derived from NMR spectral data and degradation. The mechanism of flavour formation is discussed.

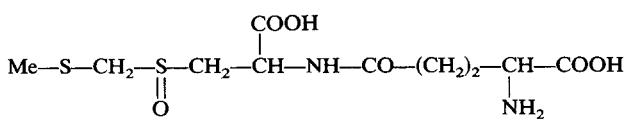
## EINLEITUNG

Vor kurzem berichteten wir [1] über  $\gamma$ -Glutamyl-Marasmin (**1**), einen Geruchs-Precursor der Basidiomyceten-Pilze *Marasmius alliaceus* (Jacq.), *M. prasiosmus* (Fr.) und *M. scorodonius* (Fr.) Quel. Bei der Geruchsbildung wirk dieses S-haltige Peptid in einem zweistufigen enzymatischen Abbau in Glutaminsäure, Brenztraubensäure, Ammoniak und stark lauchartig riechende Schwefelverbindungen gespalten. Einen weiteren Geruchs- und Aromabildner isolierten wir nach dem gleichen Verfahren aus den nahe verwandten Pilzen, *Micromphale perforans* (Hofm. ex Fr.) Sing. und *Collybia hariolorum* (DC ex Fr.) Quel., der sich überraschend identisch mit Lentinsäure (**2**) [2] erwies, die bereits früher aus dem japanischen Shiitake-Pilz *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. isoliert worden war. Die von Yasumoto *et al.* [2] vorgeschlagene Partialstruktur der Lentinsäure konnten wir durch die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren bestätigen, die vollständige Strukturaufklärung gelang nach der schonenden Derivatisierung mit Hexafluoraceton [3].

Hier soll über die Untersuchung von drei weiteren Pilzarten, *Micromphale foetidum* (Sow. ex Fr.) Sing., *M. cauetii* (Mre. u. Kühn. ex Hora) und *Collybia impudica* (Fr.) Sing. berichtet werden, die uns durch die dankenswerte Mithilfe von Prof. Dr. M. Moser (Innsbruck) und Prof. Dr. N. Biniyamini (Tel-Aviv) in getrocknetem Zustand in 5-10 g Mengen zur Verfügung standen

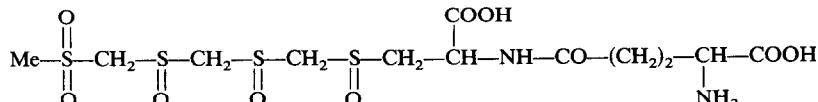
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Alle drei Arten entwickeln bei Anfeuchten mit Wasser den typischen foetiden Geruch mit 'Kohl-Zwiebel-Note' wie er auch schon bei *Micromphale perforans* und *Collybia hariolorum* aufgefallen war. Diese organoleptische Vorprüfung erwies sich bei unserem Screening wegen der großen Empfindlichkeit und Spezifität anderen analytischen Methoden überlegen. Danach schienen in den genannten Pilzen mit  $\gamma$ -Glutamyl-Marasmin und Lentinsäure verwandte Geruchsvorläufer vorzuliegen, die durch vorhandene und bei Anfeuchten aktivierte Enzyme in die Aroma-stoffe umgewandelt werden. Für eine dünnenschicht- und



**2 Lentinsäure**

**3 Epilentinsäure**



papierchromatographische Untersuchung wurden wäßrigmethanolische Auszüge von *Micromphale foetidum*, *M. cauetii* und *Collybia impudica* hergestellt und mit Lentinsäure verglichen. In allen Fällen war eine Substanz mit dem  $R_f$ -Wert der Lentinsäure vorhanden, die sich mit Ninhydrin orange-rot anfärben ließ und mit Jodplatinat gelbe Flecke auf rotem Hintergrund ergab. Im Dünnenschicht-Elektropherogramm wanderte die Substanz etwas langsamer als Glutaminsäure zur Anode. Sie verhält sich also auch hier wie andere  $\gamma$ -Glutamylpeptide (Glutathion,  $\gamma$ -Glutamyl-Alanin und Lentinsäure). Die präparative Trennung erfolgte durch aufeinander folgende Chromatographie an einem sauren und einem basischen Ionenaustrauscher und nachfolgende Kristallisation. Bei allen untersuchten Pilzen lagen die Ausbeuten im Bereich von 2% bezogen auf die getrockneten Fruchtkörper. Nach den Elementaranalysen besitzen die Isolate **3** die gleiche Bruttozusammensetzung wie die Lentinsäure,  $C_{12}H_{22}N_2S_4O_{10}$  [2]. Auch in den IR-Spektren stimmen sie weitgehend mit Lentinsäure überein. Weiterhin wurde bei der Raney-Ni-Reduktion wie bei Lentinsäure  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-alanin isoliert, was für ein schwefelsubstituiertes  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cystein oder -cysteinsulfoxid sprach. Die  $^{13}C$ -NMR-Spektren von **3** zeigen ebenfalls eine große Ähnlichkeit mit Lentinsäure an. So findet man neben Signalen für einen  $\gamma$ -Glutamylecysteinsulfoxid-Rest Signale für eine Methyl- und drei Methylengruppen bei  $\delta$  43.5 bzw. 66–70 ppm, die gegenüber der Lentinsäure nur geringfügig verschoben sind. Daraus muß man schließen, daß es sich bei der hier isolierten Verbindung um ein Epimer der Lentinsäure handelt. Mit drei chiralen Sulfoxidgruppen in der Seitenkette sind acht stereoisomere Formen mit L-Konfiguration im Peptidteil möglich. Welche Konfiguration in der Lentinsäure und der nun Epilentinsäure genannten Verbindung vorliegt, kann aus den spektroskopischen Daten ebensowenig abgeleitet werden wie die Konfigurationsunterschiede zwischen Lentin-(**2**) und Epilentinsäure (**3**).

Bemerkenswert ist, daß die aus verschiedenen Pilzen isolierte Epilentinsäure wechselnde Mengen Lentinsäure enthält, deren Anteil aus den  $^{13}C$ -NMR-Spektren abgeschätzt werden kann. Wie Tabelle 1 zeigt, korrelieren große Anteile Lentinsäure mit niedrigen Schmelzpunkten und niedrigen optischen Drehwerten. Mit Schmp. 221° besitzt ein Isolat aus *M. foetidum* den höchsten aller beobachteten

Schmelzpunkte und zeigt im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum keine Verunreinigungen von Lentinsäure mehr. Anteile bis ca 30% Lentinsäure senken den Schmelzpunkt auf 199° ab. In diesem Zusammenhang überprüften wir auch die Schmelzpunkte der verschiedenen Isolate von Lentinsäure und fanden, daß der in der Literatur [2] angegebene und auch von uns früher gefundene Schmelzpunkt von 157° nach den  $^{13}C$ -NMR-Spektren einem Gemisch von ca 90% Lentin- und 10% Epilentinsäure entspricht. Reine Lentinsäure schmilzt, ebenso wie die von Prof. Yasumoto freundlicherweise zur Verfügung gestellte Probe authentischer Lentinsäure unter Zersetzung bei 186°.

Auch in den  $^1H$ -NMR-Spektren ist nach Deaktivierung mit Hexafluoracetone die Zumischung des jeweils anderen Epimers im Bereich der Methylen signale nachzuweisen. So enthielt eine von uns früher untersuchte Spezies von *Lentinus edodes* (Marktware Tokyo) ca 30% Epilentinsäure [3], ein Kristallsat aus *M. foetidum* vom Schmp. 200° ca 25% Lentin- neben Epilentinsäure (vgl. Abb. 1). Da die Signallagen im Methylenbereich jedoch außerordentlich stark vom Anteil der Wasserspuren in der Probe abhängen, ergeben sich keine reproduzierbaren Aufspaltungsmuster, was die Interpretation sehr erschwert. Leichter sind—bei optimaler Geräteauflösung—die Epimeren an dem Signal der Methylsulfonylgruppe zu erkennen. Während freie Lentinsäure in  $D_2O$  und sein Hexafluoroxazolidinon [3] in  $DMSO-d_6$  Signale bei 3.28 bzw. 3.17 ppm ergeben, liegen die entsprechenden Signale bei der Epilentinsäure 0.01 ppm bei tieferem Feld.

Nach einer kurSORischen Untersuchung enthalten die Mutterlaugen bei der Isolierung von Lentinsäure und Epilentinsäure jeweils mehr vom 'falschen' Epimer als das Kristallsat. Wir schließen daraus, daß in den untersuchten Pilzen immer Gemische von Lentin- und Epilentinsäure (oder weiterer Epimerer) gebildet werden, jedoch nur das jeweils vorherrschende Epimer in reiner Form gewonnen werden kann. Versuche zur analytischen Bestimmung des Epimerenverhältnisses in Rohextrakten mittels HPLC sind im Gange.

Alle drei Arten, *Micromphale foetidum*, *M. cauetii* und *Collybia impudica* enthalten wie *Lentinus edodes*, *Collybia hariolorum*, *Micromphale perforans*, *Marasmius scorodonius*, *M. alliaceus* und *M. prasioides*  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen, die den ersten enzymatischen Spaltungsschritt der Aromavorstufen einleiten. Weiterhin enthalten sie CS-Lyasen, die spezifisch S-Alkyl-L-Cysteinsulfoxide vom Alliin-Typ spalten [4]. Im Gegensatz dazu spaltet die CS-Lyase von *Marasmius scorodonius* sowohl L-Cystein, S-Alkyl- und S-Aryl-L-Cysteine als auch die entsprechenden Sulfoxid-Derivate und besitzt somit in ihrer breiten Substratspezifität auffallende Ähnlichkeit zur CS-Lyase aus den Samen von *Albizia lophantha* (Mimosaceae) [5].

Bei der in den Pilzen stattfindenden, zweistufigen Enzymspaltung von Epilentinsäure durch  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase und anschließend durch CS-Lyase entstehen, wie durch PC und DC nachgewiesen wurde, Glutaminsäure, Brenztraubensäure, Ammoniak sowie S-haltige Geruchs- und Aromastoffe vom Typ des Lenthionins **5**. Die Verbindungen der Lenthionin-Gruppe, die von Morita *et al.* [6], strukturell aufgeklärt wurden, enthalten interessante 5-, 6-

Tabelle 1. Physikalische Daten und Vorkommen von Epilentinsäure **3** und Lentinsäure **2** in verschiedenen Pilzen

Spezies	Schmp. (°)	$[\alpha]_{D}^{2.2*}$	<b>3:2†</b>
<i>Micromphale foetidum</i>			
1. Fraktion	221	+58.8	100: 0
2. Fraktion	202	+46.3	70: 30
<i>Micromphale cauetii</i>			
	215	—	90: 10
<i>Collybia impudica</i>			
	205	—	75: 25
<i>Lentinus edodes</i>			
	186	+27.0	0: 100

\* $c = 0.9$  in 0.1 N  $NaHCO_3$ .

† $^1H$ -NMR-spektroskopisch als Hexafluoroxazolidinone in  $DMSO-d_6/CDCl_3$  oder  $^{13}C$ -NMR-spektroskopisch in  $H_2O/NaHCO_3$  bestimmt; Fehler  $\pm 5\%$ .

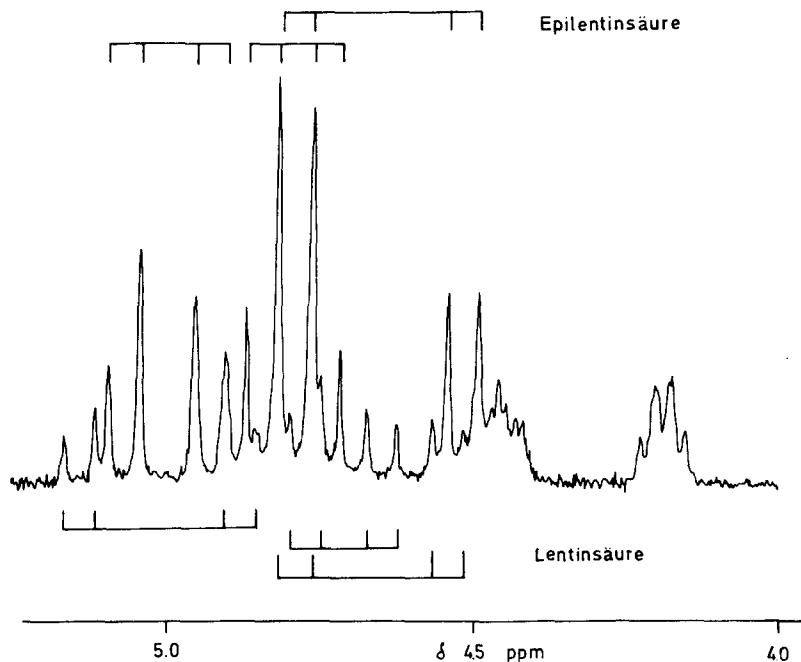
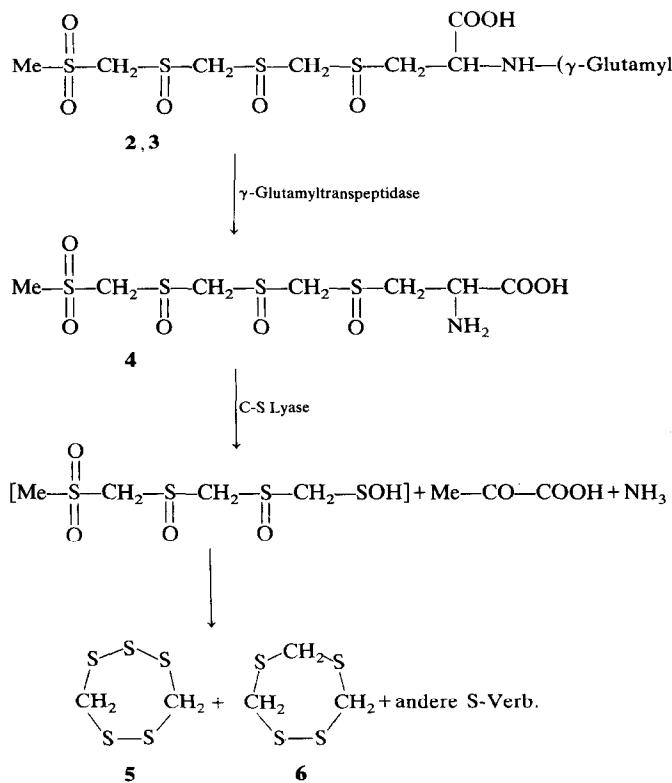


Abb. 1. Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum eines Gemisches von Epolentinsäure und Lentinsäure (als Hexafluoroxazolidinone in  $\text{DMSO}-d_6$ ).

und 7-Ring-Systeme mit  $\text{CH}_2$ -Gruppen und mehreren S-Atomen und sind für den foetiden Geruch und aromatischen Geschmack dieser Pilze verantwortlich. Auch in den Namen dieser Pilze kommt dies zum Ausdruck (*M. foetidum*, *C. impudica*, *M. brassicola*, *C. porrea*). Bemerkenswert ist, daß diese und verwandte Verbindungen inzwischen auch in Rotalgen aufgefunden wurden [7].

Die im Pilz stattfindene zweistufige Spaltung von Epilentinsäure in die genannten Spaltprodukte und Geruchs- und Aromastoffe läßt sich auch *in vitro* nachvollziehen, wenn man zu einer auf pH 8–8.5 gepufferten Lösung von Epilentinsäure  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase aus Schweineieren und gereinigte CS-Lyase aus *Albizia lophantha*-Samen gibt.



Wird Epilentinsäure nur mit CS-Lyase (aus *Albizia lophantha* oder aus *Marasmius scorodonius*) behandelt, bleibt jegliche Spaltung und Geruchsbildung aus. Andererseits werden L-Glutaminsäure und Desglutamyl-Eplentinsäure gebildet, wenn eine gepufferte Lösung (pH 8.5) von Epilentinsäure mit  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase aus Schweinenieren inkubiert wird.

Die gebildete Desglutamyl-Eplentinsäure (**4**) weist im PC und DC gleiche  $R_f$ -Werte auf wie Desglutamyl-lentinsäure.

Beide Verbindungen lassen sich als Schwefel-Verbindungen auf Papierchromatogrammen sehr spezifisch nachweisen, wenn man die entwickelten und scharf getrockneten Papierbögen mit ammonikalischer  $\text{AgNO}_3$ -Lösung besprüht und sie anschließend 10 min auf 120° im Trockenschrank erhitzt. Es bilden sich grauschwarze Flecke, die durch anschließendes Behandeln mit 1%  $\text{HNO}_3$ -Lösung und nachfolgendem Waschen mit dest. Wasser deutlich hervortreten und haltbar werden. Diese Nachweisreaktion gibt mit  $\gamma$ -Glutamyl-Marasmin, mit Lentinsäure und Epilentinsäure ausgezeichnete Resultate und ist somit hervorragend geeignet für ein 'Pilz-Screening' auf S-haltige Pilz-Inhaltstoffe. Ihre Anwendbarkeit beschränkt sich allerdings auf Papierchromatogramme. Zur Vorprüfung von frischen und schonend getrockneten Pilzen auf  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen werden Lösungen von  $\gamma$ -Glutamyl-4-nitroanilid in Tris-HCl-Puffer bei pH 8 mit Pilz-Homogenaten oder mit Pilz-Pulver inkubiert. Vorhandene  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen setzen aus dem farblosen Substrat das stark gelb gefärbte 4-Nitroanilin frei (s. Experimentelles). Ebenso lassen sich CS-Lyasen in Pilzen nach Inkubation mit geeigneten Substraten (*S*-Allyl-L-Cystein, *S*-Allyl-L-Cysteinsulfoxid = Alliin, *S*-4-Nitrophenyl-L-Cystein oder *S*-(2-5-Nitropyridyl)-L-Cystein etc. durch die Bildung von intensiven Geruchs- und Geschmacksstoffen und die auftretende Gelbfärbung leicht nachweisen.

## EXPERIMENTELLES

<sup>1</sup>H-NMR: Bruker WH 270; <sup>13</sup>C-NMR: Varian CFT 20; Schmelzpunkte: Apparat nach Tottoli (Büchi), 4°/min, Start 150°.

**Herstellung der Pilzextrakte.** 5 g luftgetrocknete und fein gemahlene Fruchtkörper von *Micromphale foetidum* (MFM), *M. cauvetii* (MCI) und *Collybia impudica* (CI) wurden in je 30 ml kochendes  $\text{H}_2\text{O}$  eingerührt und 5–10 min im siedenden Wasserbad belassen. Nach Abkühlen setzte man 30 ml MeOH zu, um störende Schleimstoffe auszufällen und filtrierte. Die Filterrückstände wurden noch zweimal in gleicher Weise mit  $\text{H}_2\text{O}$  und MeOH behandelt. Die vereinigten Filtrate wurden i. Vak. auf ca 25 ml konzentriert und dienten für die DC- und PC-Analysen, DC-Elektrophoresen und die Isolierung.

**DC, PC und DS-Elektrophorese der Pilzauszüge.** Von den oben erhaltenen Extraktten von MFM, MCI und CI wurden je 6  $\mu\text{l}$  Portionen auf Kieselgel-F 254 Alufolien (Merck) bzw. 10  $\mu\text{l}$  auf Papier bögen (20 × 20 cm, MN-214 von Macherey und Nagel) aufgetragen. Als Vergleichssubstanzen dienten Glutaminsäure, Lentinsäure, Alanin und Methionin (2  $\mu\text{l}$  der 1%-igen Lösungen in  $\text{H}_2\text{O}$ ). Nach Entwickeln der Chromatogramme wurden die DC und PC bei 100° getrocknet. Die Anfärbung erfolgte mit Ninhydrin (0.2% ige Lösung

Tabelle 2.  $R_f$ -Werte bei der Papierchromatographie von Pilzauszügen mit den fließmitteln F1–F4\*

Verbindung	$R_f$ -Werte			
	F1	F2	F3	F4
Eplentinsäure	0.04	0.08	0.10	0.26
Lentinsäure	0.04	0.08	0.10	0.26
Desglutamyllentinsäure	0.08	0.14	0.23	0.14
Desglutamyleplentinsäure	0.08	0.14	0.23	0.14
$\gamma$ -Glutamylmarasmin	0.13	0.14	0.11	0.40
$\gamma$ -Glutamylalanin	0.08	0.17	0.11	0.36
Glutaminsäure	0.20	0.23	0.09	0.40
Alanin	0.17	0.23	0.16	0.33
Methionin	0.29	0.36	0.34	0.48

\*F1:  $n\text{-BuOH-HOAc-H}_2\text{O}$  (4:1:2), F2:  $n\text{-BuOH-HOAc-i-PrOH-H}_2\text{O}$  (8:2:3:5), F3:  $\text{PhOH-H}_2\text{O}$  (9:1), F4:  $i\text{-PrOH-H}_2\text{O}$  (7:3).

in  $\text{Me}_2\text{CO}$ , erhitzen auf 100°C bis zur Fleckenbildung) und mit K-Jodplatinat (0.1% in  $\text{H}_2$ , gelbe Flecke auf rotem Grund).

Zur DS-Elektrophorese wurden auf Kieselgelplatten von Macherey und Nagel (20 × 20 cm) neben den Pilzauszügen je 10  $\mu\text{l}$  einer 1% igen wäßrigen Lösung von Asparagin-, Glutamin-, Pikrin- und Lentinsäure, Glutathion und Alanin aufgetragen. Nach 25–30 min Elektrophorese bei 900 V und 40 mA wurden die Platten bei 100° getrocknet und wie bei der DC angegeben mit Reagenz-Lösungen besprüht. Die angenebenen, zur Anode hin zurückgelegten Strecken beziehen sich auf Alanin als neutrale Aminosäure.

**Isolierung von Eplentinsäure (3).** Die oben erhaltenen wäßrigen Pilzextrakte wurden auf eine Säule mit Amberlite IR 120 ( $\text{H}^+$ -Form) gegeben. Der Durchlauf enthielt nach DC keine freien Aminosäuren oder Peptide und wurde verworfen. Nach Waschen mit 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  eluierte man mit 100 bis 150 ml wäßrigem Ammoniak (7%). Das Eluat wurde i. Vak. eingeeengt, auf eine Säule mit Sephadex A 25 DEAE (φ 2 cm, Höhe 16 cm, Acetat-Form) aufgetragen und mit 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  nachgewaschen. Die Elution der sauren Aminosäuren und Peptide erfolgte mit einem  $\text{H}_2\text{O-HOAc}$  Gradienten (0.5–5% HOAc). Die Eplentinsäure erscheint dabei nach Glutamin- und Asparaginsäure und war meist frei von Verunreinigungen. War das nicht der Fall, so wurde die Chromatographie über Sephadex wiederholt. Infolge der

Tabelle 3. DS-Elektrophorese der Pilzauszüge bei verschiedenen pH-Werten\*

Verbindung	Wanderung (cm)		
	pH 4.9	pH 5.5	pH 6.5
Alanin	–0.6	–1.2	± 0.0
Lentinsäure	+2.0	+2.4	+2.8
Eplentinsäure	+2.0	+2.4	+2.8
$\gamma$ -Glutamylmarasmin	+2.0	+2.4	+3.2
$\gamma$ -Glutamylalanin	+2.5	+3.4	—
Glutaminsäure	+3.2	+4.0	+5.5
Asparaginsäure	+4.0	+5.1	+5.7
Glutathion	+2.1	+2.9	+3.1
<i>S</i> -(2-Carboxyethyl)-Cystein	+3.7	+3.4	+4.4
Pikrinsäure	+4.9	+6.5	+5.7

\*pH 5.5: m/30 Phosphat; pH 4.9 und 6.5: Pyridin-Essigsäure.

geringen Löslichkeit in  $H_2O$ -HOAc kristallisierte ein Teil der Epilentinsäure bereits aus den Säuleneluatn beim Stehen im Eisschrank aus. Weitere Fraktionen konnten nach Einengen i. Vak. und Zusatz von EtOH erhalten werden. Ausb. 15 mg (0.3%) (1. Fraktion); ca 85 mg (1.7%) (2. Fraktion) (gef. C, 29.41; H, 4.60; N, 5.87.  $C_{12}H_{22}N_2S_4O_{10}$  erford. C, 29.87; H, 4.60; N, 5.81%).  $^{13}C$ -NMR- ( $H_2O$ +NaHCO<sub>3</sub>): δ 26.8; 32.1; 43.5 (43.3); 49.7; 54.3; 54.9; 66.6 (66.1); 69.1 (66.4); 69.5 (69.5); (Die Werte in Klammern beziehen sich auf zugemischte Lentinsäure).

**Reduktive Spaltung von Epilentinsäure.** **3** (10 mg) wurden in 1 ml  $H_2O$  mit 0.1 g Raney-Ni 4 hr bei Raumtemperatur gerührt. Nach Behandeln mit  $H_2S$  wurde durch Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50 ( $H^+$ -Form)  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-alanin isoliert und durch die physikalischen Daten und die optische Drehung identifiziert.  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase aus Schweinenieren spaltet in L-Alanin und L-Glutaminsäure.

**Spaltung von Epilentinsäure durch  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase.** **3** (10 mg) wurde in 2 ml Tris-HCl Puffer pH 8 gelöst und mit 2 mg  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase aus Schweinenieren und 1 Tropfen Toluol zur Konservierung versetzt. Nach 12 hr Inkubation bei Raumtemperatur wurden 5 µl Proben der Reaktionsmischung mit DC und PC untersucht (Bedingungen siehe oben). Die Spaltprodukte waren Glutaminsäure und Desglutamyl-epilentinsäure **4**, die den gleichen  $R_f$ -Wert wie Desglutamyl-lentinsäure [1, 2] aufweist.

**Spaltung der Desglutamyl-epilentinsäure durch C-S Lyase.** Die oben erhaltene Lösung von **4** wurde mit 1 ml einer Lösung von C-S Lyase (vgl. unten) und 0.1 ml einer 0.1% igen Lösung von Pyridoxalphosphat versetzt. Nach wenigen Minuten trat der für die frischen Pilze charakteristische Geruch auf. Der Nachweis der Spaltprodukte erfolgte nach 2 hr Inkubation bei Raumtemperatur: Brenztraubensäure durch DC und Anfärben mit o-Phenyldiamin oder 2,4-Dinitrophenylhydrazin, Ammoniak durch Mikrodiffusion nach Conway und Nachweis mit Neßlers Reagenz. Die S-haltigen Spaltprodukte wurden mit  $CH_2Cl_2$  extrahiert und durch DC (Kieselgel, Hexan-CHCl<sub>3</sub>, 2:1) als Lenthionin [6] und Tetrathiepan [6] ( $R_f$  0.46 bzw. 0.32) identifiziert (Anfärbung mit Jodplatinat, Jod-Azid-Stark Reagenz oder 1% KMnO<sub>4</sub>-Lösung).

**Darstellung von C-S Lyase aus Samen von Albizia lophantha.** Endosperm Pulver der Samen von *Albizia lophantha* Benth. (Mimosaceae) (1 g) wurde 10 min mit 10 ml  $H_2O$  verrührt und zentrifugiert. Nach Einstellen des überstandes mit Phosphorsäure auf pH 5 zentrifugierte man erneut. Anschließend brachte man den überstand mit 0.1 N NaOH auf pH 8 und gab ihn auf eine Säule mit 200 ml Sephadex G 25. Bei der Elution mit m/30 Phosphatpuffer pH 8 wurde eine beim kräftigen Schütteln schäumende Fraktion

erhalten, die nach Test mit S-Allyl-L-Cystein (Geruchsbildung) und S-(p-Nitrophenyl)-L-Cystein (Gelbfärbung) die C-S Lyase Aktivität enthielt. Nach Konservierung mit einigen Tropfen Toluol konnte diese Lösung ohne Aktivitätsverlust im Eisschrank aufbewahrt werden.

**Nachweis von  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidasen (a) und C-S Lyasen (b) in den getrockneten Fruchtkörpern von MFM, MCI und CI.** (a)  $\gamma$ -L-Glutamyl-4-nitroanilid wurden in wenig Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid gelöst und unter kräftigem Rühren in 10 ml Tris-HCl Puffer pH 8 einge-tragen. Zum Enzymnachweis gab man je 10 mg Pilzpulver zu 2 ml dieser Substratlösung. In allen Fällen beobachtete man nach wenigen Minuten eine deutliche Gelbfärbung durch das freigesetzte p-Nitroanilin. (b) S-Allyl-L-Cysteinsulfoxid (Alliin) (0.1 g) wurde in 10 ml m/30 Phosphatpuffer pH 8 gelöst und mit 0.1 ml einer 0.1% igen Lösung von Pyridoxalphosphat in  $H_2O$  versetzt. In je 2 ml dieser Substratlösung rührte man 10 mg Pilzpulver ein und inkubierte 1 hr bei Raumtemperatur. Es entwickelte sich in allen Fällen der typische scharfe Geschmack und das Aroma des Allicins (Diallyl-disulfidoxid) und es konnten Brenztraubensäure und Ammoniak nachgewiesen werden. Da S-Alkyl- und S-Allyl-L-Cystein auf diese Weise nicht gespalten wurde, liegt in den untersuchten Pilzen eine C-S Lyase vom Typ der Alliinase des Knoblauchs vor.

**Anerkennung**—Für die Beschaffung von Pilzmaterial sei Herrn Prof. Dr. M. Moser (Innsbruck) und Herrn Prof. Dr. N. Biniyamini (Tel-Aviv), für technische Mitarbeit Frau C. Somol und Herrn F. Höfle gedankt. Dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für finanzielle Unterstützung.

## LITERATUR

1. Gmelin, R., Luxa, H.-H., Roth, K. und Höfle, G. (1976) *Phytochemistry* **15**, 1717.
2. Yasumoto, K., Iwami, K. und Mitsuda, H. *Agric. Biol. Chem.* **35**, 2059 (1971).
3. Höfle, G., Gmelin, R., Luxa, H.-H., N'Galamulume-Treves, M. und Hatanaka, Sh. I. (1976) *Tetrahedron Letters* 3129.
4. Stoll, A. und Seebeck, E. (1950) *Sci. Pharm.* **18**, 61.
5. Gmelin, R., Hasenmaier, G., Strauss, G. (1957) *Z. Naturforsch.* **12B**, 687.
6. Morita, K. und Kobayashi, S., (1967) *Chem. Pharm. Bull.* **15**, 988; Nishikawa, M., Kanaya, K., Kobayashi, S., Morita, K., und Tomiie, Y. (1967) *Chem. Pharm. Bull.* **15**, 756.
7. Wratten, S. J. und Faulkner, D. J. (1976) *J. Org. Chem.* **41**, 2465.