

Plant & Cell Physiol., 4, 103~112 (1963)

ÜBER DEN PROTEINUMSATZ IN DEN
GRÜNEN BLÄTTERN
IV. DARSTELLUNG DES ASPARAGINS UND DES LEUCINS
AUS DEN ROBINIENBLÄTTERN UNTER VERSCHIEDENEN
BEDINGUNGEN

YASUO TAZAWA

*Biologisches Laboratorium der Fakultät der Wissenschaft,
Niigata Universität, Niigata*

(Eingegangen am 9. Januar, 1963)

Die Art und Natur der N-Bestandteile in Robinienblättern stehen im innigsten Zusammenhang mit ihren Vegetationszuständen. Bei der Vergilbung erleidet das Blattprotein einen ziemlich grossen Verlust. Diese Veränderung ist ausnahmslos auch bei reifen Blättern im verhungerten Zustand bemerkbar. In den Blättern, welche auf abgeschnittenen Stengeln zur Wasserkultur in Dunkelheit unterworfen sind, tritt eine starke Anhäufung des Asparagins auf Kosten des Proteins hervor. Beim Überlassen der frischen Blätter im Toluolwasser entsteht das Leucin als ein Abbauprodukt des Blattproteins, während aber dabei keine Amidbildung stattfindet. Aus dem Autolysate der Blätter lässt sich eine Protease als Pulver darstellen. Das Enzym greift die Gelatine optimal bei pH 6.0 an. In diesem Präparat sind noch einige Peptidasen und Asparaginase als Beimischungen enthalten.

Schon früh hat BORODIN (1) durch mikrochemische Methode bei vielen Holzgewächsen wie *Tilia parvifolia*, *Syringa vulgaris*, *Sorbus aucuparia*, *Populus tremula* und *Quercus pedunculata* nachgewiesen, dass die Blattknospen besonders dann sehr reich an Asparagin werden, wenn sie sich auf abgeschnittenen Zweigen mit Wasser kultivieren lassen. SCHULZE und BOSSHARD (2) (1885) haben unter Verwendung der mit Quecksilbernitrat durchgeführten Fällungsmethode bei den Pflanzen wie *Platanus orientalis*, *Acer pseudoplatanus*, *Acer campestre*, *Betula alba*, *Fagus sylvatica*, *Tilia parvifolia*, *Populus nigra* und *Vitis vinifera* die Versuche von BORODIN wiederholt und beobachtet, dass dabei ausser dem Asparagin auch das

Allantoin entstehen kann. Weiterhin wurde es von SCHULZE (2) (1895) dargetan, dass das Glutamin in den Blättern von Farnkräutern, Rübe und Kohlrabi an Stelle des Asparagins auftritt. Die Glutaminbildung in den Blättern der Holzpflanze wurde nachher von DELEANO (3) an *Vitis vinifera* nachgewiesen. Auf Grund dieser Tatsachen hat SCHULZE (2) (1898-99) die Ansicht vertreten, dass die hydrolytische Spaltung des Proteins im Pflanzenorganismus tatsächlich eine unerlässliche Vorbedingung für die Amidbildung darbiere. Die diesbezüglichen Untersuchungen wurden in neuerer Zeit von CHIBNALL (4) bei Blättern von *Phaseolus multiflorus*, und von YEMM (5) bei Gerstenblättern weiter durchgeführt, woraus die Annahme von SCHULZE als richtig gefolgert wurde.

Im Anschluss an den vorher von uns (6) dargelegten Tatbeständen habe ich nun die Versuche mit Robinienblättern angestellt, um damit die oben angeführten N-Stoffwechselforgänge im Blatt näher zu studieren. Die Robinie (*Robinia pseudacacia*) ist eine Pflanze, welche in hiesiger Gegend am üppigsten auswächst und derenthalben uns jahraus ein gutes Versuchsobjekt darstellt.

MATERIAL UND METHODE

Normales Blatt

In den Blattknospen, welche am Ende April auszusprossen anfangen, ist das Chloroplast noch nicht ausgebildet. Dann vergrünen die entwickelten Blätter im Licht, aber sie sind frei von Stärkekörnern bis zum Stadium, wo die Blütezeit beendet ist. Diese Blätter werden als „Junge“ genannt. Erst in der Mitte Juni wird die Assimilationsstärke im Chloroplast deutlich gemacht, und solcher Zustand dauert bis zum Anfang Oktober. Die Blätter werden als „Reife“ bezeichnet. Im späteren Herbst werden die Blätter unter Degeneration des Chloroplastes vergilbt und abfallen. Diese Blätter werden als „Alte“ benannt. Hierbei fragt es sich, was für eine Veränderung in den N-Bestandteilen damit herbeigeführt werde. Um einen Aufschluss dieser Frage zu geben, habe ich die N-Verteilung im Blatt von verschiedenen Vegetationsstadien in folgender Weise gemessen.

Gesamt-N—10-15 mg Blattpulver, getrocknet bei 105°, wurden zur Mikro-N-Bestimmung nach KJELDAHL-PREGL (6) herangezogen.

Nichtprot.-N—40-50 g frischer Blätter wurden zweimal mit 300 ml heissem Wasser ausgezogen. Der Extrakt wurde unter vermindertem Druck verdampft, und der abgeschiedene Fällungskörper wurde entfernt. Das Konzentrat wurde mit Waschwasser vereinigt, und das gesamte Volumen der Lösung wurde auf 10-15 ml gebracht. An 0.1-0.2 ml dieser Probe wurde der Gesamt-N wie oben bestimmt, und dessen Wert wurde als Nichtprot.-N angegeben.

Amino-N—1.0-2.0 ml der Probe wurden zur Amino-N-Bestimmung nach VAN SLYKE (6) herangestellt.

Amid-N—Der Amid-N wurde nach SACHSSE (6) gemessen. 1.0 ml Ansatz wurde mit 2 ml 5 N H₂SO₄ hydrolysiert, und das dabei entstandene Ammoniak wurde durch Titrationsmethode bestimmt.

Proteingehalt—Die Werte von Gesamt-N minus Nichtprot.-N wurden als Prot.-N angegeben. Die Zahlen von Prot.-N × 6.25 wurden als Proteingehalt im Blatt angegeben.

Verhungertes Blatt

Die mit Blättern besetzten Zweige wurden von den Bäumen abgetrennt, mit dem unteren Enden in dest. Wasser getaucht und so im dunklen Raum belassen. Nach bestimmter Kulturdauer wurden die Blätter abgepflückt und im Trockenschrank bei 60° getrocknet. 15–20 g des Blattmaterials wurden mit heissem Wasser extrahiert, und der Auszug wurde zum bestimmten Volumen eingengt. An den Proben des Konzentrates wurde die N-Verteilung wie üblich bestimmt. Die Werte von Prot.-N-

TABELLE I
Jahreszeitliche Veränderung der N-Bestandteile im Blattgewebe von Robinia pseudacacia

Art des Blattes: Datum der Sammlung	Gesamt-N (% des tr. Bl.)	Nichtprot.-N (mg pro 1 g tr. Bl.)			Protein- gehalt (% des tr. Bl.)
		Gesamt- N	Amino- N	Amid- N	
<i>Grünes Blatt:</i>					
d. 24. April	7.00	11.81	1.78	1.07	36.38
d. 22. Mai	6.29	9.72	1.38	1.59	33.25
d. 20. Juni	4.33	4.40	0.92	0.43	24.31
d. 10. Juli	4.32	4.39	0.69	0.50	24.25
d. 20. August	4.00	3.05	0.54	0.37	23.06
d. 20. Oktober	3.94	3.37	0.52	0.32	22.50
d. 2. November	3.34	3.50	0.50	0.40	18.69
<i>Vergilbtes Blatt:</i>					
d. 2. November	2.51	4.00	0.55	0.42	13.19

Abnahme in Prozenten vom Gesamtprot.-N wurden als Proteolysengrad angegeben.

Zur Gewinnung des Asparagins wurden je in einem Versuche etwa 100 g lufttrockner Blätter mit heissem Wasser ausgezogen.

Autolysiertes Blatt

70 g der frischen Blätter vom bestimmten Wachstumsstadium wurden mit 100 ml Toluolwasser versetzt und bei 30° überlassen. Nach verschiedenen Versuchsdauern wurde die Aufschwemmung abgepresst, und der Rückstand wurde mit heissem Wasser extrahiert. Der Auszug wurde im Vakuum

Literatur S. 111, 112

eingengt und filtriert. Das Filtrat wurde mit Waschwasser vereinigt, und das gesammte Volumen der Lösung wurde auf etwa 15 ml gebracht. An diesen Proben wurde die N-Verteilung in üblicher Weise bestimmt, und der Proteolysengrad wurde ergeben.

Zur Darstellung des Leucins und der Protease wurden die frischen Blätter im grossen verwendet.

ERGEBNISSE

Jahreszeitliche Veränderung der N-Bestandteile in den Robinienblättern

Wie aus Tab. I hervorgeht, vermindert das Protein des Blattes stetig im Verlaufe des Lebensvorganges, was sich auf die Alterung des Blattes zu beziehen erscheint.

Verhungerungsversuche

Proteolysengrad im excisierten Blatt—Wie man aus Tab. II ersieht, wird das Blattprotein im verhungerten Zustande unter Zunahme von Amino-N und Amid-N aufgespalten.

TABELLE II

Proteolysengrad der verhungerten Blätter von Robinia pseudacacia

Art des Blattes: Datum der Sammlung	Kultur- dauer (Tag)	Gesamt-N (% des tr. Bl.)	Nichtprot.-N (mg pro 1 g tr. Bl.)			Proteo- lysen- grad (%)
			Gesamt- N	Amino- N	Amid- N	
Junges Blatt:						
d. 6—12. Mai	0	5.85	7.38	1.07	1.03	—
	3	5.69	11.90	1.89	1.97	11.9
	6	5.79	13.35	3.78	2.51	12.9
Reifes Blatt:						
d. 21—27. Juni	0	4.71	6.01	1.36	1.20	—
	3	4.60	8.34	1.90	2.33	8.3
	6	4.80	11.60	3.49	2.45	10.0
Reifes Blatt:						
d. 21—27. Juli	0	4.40	4.26	0.66	0.54	—
	3	—	8.13	2.12	1.96	9.5
	6	—	8.34	2.49	2.00	10.3

Darstellung des Asparagins aus verhungerten Blättern—Die Blätter wurden auf abgeschnittenen Stengeln mit dest. Wasser unter Abschluss des Lichtes eine Woche lang kultiviert. 100 g des lufttrocknen Blattmaterials wurden mit heissem Wasser ausgezogen. Der Extrakt wurde unter vermindertem Druck eingengt, und der dabei entstandene Fällungskörper wurde entfernt. Die filtrierte Lösung wurde mit Alkohol bis zur schwachen

Trübung zugesetzt, und die Flockung wurde abgetrennt. Die alkoholische Lösung wurde eingeeengt und im Refrigerator übergelassen. Wenn das Asparagin in reichlicher Menge vorläge, liess es sich leicht durch diese Behandlung auskrystallisieren. Im Falle eines geringfügigen Gehaltes an Asparagin verhielt sich aber diese Substanz schwer krystallisierbar. Dabei wurde die Lösung durch weiteren Zusatz des Alkohols ausgelaugt, womit das rohe Material als weisses Pulver abgetrennt wurde. Es wurde auf Tonplatte getrocknet, und durch Umfällung aus verdünntem Alkohol gereinigt. Beim Versuche mit natürlichen Blättern von verschiedenen Entwicklungsstadien hat es sich ergeben, dass dabei ausser einem syrupösen Rückstand keine Krystallisation des Asparagins erzielt werden. Aus verhungerten Blättern liess es sich aber in einer Menge von 0.2-1.0 % des lufttrocknen Materials gewinnen. Beim jungen Blatt betrug die Ausbeute viel grösser als beim alten. Durch Umkrystallisierung aus heissem Wasser wurde das Asparagin in schöner Krystallform (Fig. 1) dargestellt.

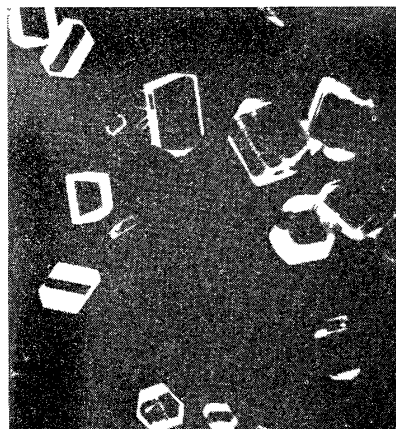


Fig. 1. Asparagin aus verhungertem Blatt von *Robinia pseudacacia*.

Analytische Ergebnisse des Asparagins—Gesamt-N (KJELDAHL)···4.3 mg Sb. : 4.05 ml N/70 H₂SO₄, 0.81 mg N. Amino-N (VAN SLYKE)···9.6 mg Sb. : 1.50 ml N₂(15°, 762 mm Hg), 0.88875 mg N. Amid-N (SACHSSE)···10.6 mg Sb. : 4.97 ml N/70 H₂SO₄, 0.994 mg N.

Für Asparagin		Gesamt-N (%)	Amino-N (%)	Amid-N (%)
C ₄ H ₈ N ₂ O ₃ ·H ₂ O	Ber.	18.67	9.34	9.34
	Gef.	18.84	9.21	9.38

Autolyse der Blätter

Proteolysengrad—Wie aus Tab. III ersichtlich, unterliegt das Blattprotein einer Selbstdigestion, wobei eine deutliche Zunahme von Amino-N stattfindet, aber keine Amidbildung hervortritt.

Darstellung des Leucins—3 kg der frischen reifen Blätter, entnommen am 10. Juli, welche zu 714 g Trockensubstanz entsprachen, wurden mit 100 ml Äther und 5 l Toluolwasser versetzt, und bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach 9 Tagen wurde die Aufschwemmung abgepresst, und der Rückstand wurde unter Zusatz von 2 l Toluolwasser noch eine Woche zur Selbstverdauung unterworfen. Danach wurde das Autolysat ausgepresst. Die vereinigten Auszüge, welche zu Gesamt-Vol. 7 l erreichten, wurden unter vermindertem Druck bei Badtemp. 60° bis auf etwa 350 ml eingeeengt, wobei sich ein gallertartiger Niederschlag abschied. Das

Literatur S. 111/112

Filtrat wurde mit 500 ml Äthylalkohol zugesetzt, und der dabei entstandene Fällungskörper wurde entfernt. Die alkoholische Lösung wurde bis auf 100 ml eingengt, und durch weiteren Zusatz des Alkohols von einer Sch-

TABELLE III

Proteolysengrad der autolysierten Blätter von Robinia pseudacacia

Art des Blattes: Datum: N-Gehalt (% des tr. Bl.)	Autolysen- dauer (Tag)	Nichtprot.-N (mg pro 1 g tr. Bl.)			Proteolysen- grad (%)
		Gesamt- N	Amino- N	Amid- N	
Junges Blatt:					
d. 8. Mai:	0	6.00	2.10	1.30	—
6.00	2	8.00	3.29	1.77	3.7
	4	9.30	3.34	1.51	6.1
	8	9.72	3.85	1.79	6.9
Junges Blatt:					
d. 29. Mai:	0	6.01	1.51	1.20	—
5.20	2	6.44	2.29	1.37	2.4
	4	7.14	2.29	1.24	3.8
	8	7.87	2.43	1.28	5.6
Reifes Blatt:					
d. 24. Juli:	0	2.78	0.47	0.48	—
4.46	2	3.77	0.68	0.66	2.4
	4	4.13	0.99	0.68	3.1
	8	4.20	1.00	0.64	3.3

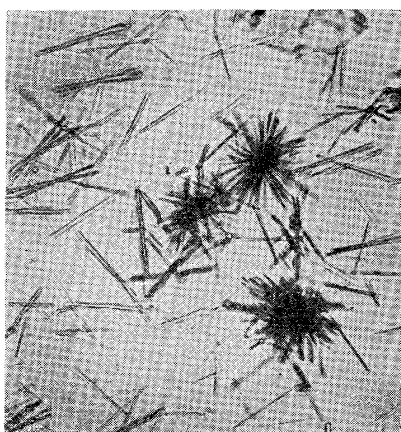


Fig. 2. Leucin aus autolysiertem Blatt von *Robinia pseudacacia*.

womit sich das Leucin als Nadelkristalle (Fig. 2) darstellen liess. Schmp. 272—275°. Ausbeute an reinem Präparat betrug etwa 0.6 g.

miere befreit. Die filtrierte Flüssigkeit wurde verdampft, und der zurückgebliebene Syrup wurde in 200 ml Methylalkohol aufgelöst. Diese Lösung wurde mit gleichem Volumen des Äthylalkohols versetzt, und die abgeschiedene Flockung wurde entfernt. Die abfiltrierte alkoholische Lösung wurde mit 400 ml Äther zugesetzt, dann liess sich ein weisses Pulver abfallen. Es wurde auf Filter gesammelt und durch Behandlung mit Alkohol ausgelaugt. Dadurch wurde das rohe Leucin in einer Ausbeute von 1.6 g gewonnen. Es lieferte positive Aminosäurereaktionen mit Kupfercarbonat oder Ninhydrin. Zur Reinigung wurde es aus 70% Alkohol umkristallisiert,

Analytische Ergebnisse des Leucins—Gesamt-N (KJELDAHL)···7.5 mg
Sbst.: 4.00 ml N/70 H₂SO₄, 0.80 mg N. NH₂-N (VAN SLYKE)···6.0 mg Sbst.:
1.10 ml N₂ (20°, 760 mm Hg), 0.6259 mg N. COOH-N (GRASSMANN)···13.0 mg
Sbst.: 4.05 ml N/40 KOH, 1.4175 mg N.

Für Leucin		Gesamt-N	NH ₂ -N	COOH-N
		(%)	(%)	(%)
C ₆ H ₁₃ NO ₂	Ber.	10.69	10.69	10.69
	Gef.	10.66	10.43	10.90

Darstellung der Protease

Protease aus Chloroplastensubstanz (Präp.-I)—Zur Darstellung des Chloroplastenmaterials wurden die frischen Blätter zerkleinert, und mittelst eines Koliertuchs abgepresst. Der Rückstand wurde mehrmals unter erneutem Zusatz des Wassers ausgeschüttelt und koliert. Der Presssaft wurde zentrifugiert, wobei sich das Chloroplast mit wenig Zellwandsplittern als Bodensatz abschied. Das Material wurde im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. 45 g dieses Grünsatzes wurden in 300 ml verd. Ammoniakwasser (pH 8.4-7.2) verteilt, und unter Toluolzusatz 3 Tage lang bei Zimmertemperatur digeriert. Danach wurde die Aufschwemmung durch mehrmaliges Wiederholen dieses Verfahrens zur Erschöpfung extrahiert, 1.5 l der vereinigten Auszüge wurden im Vakuum bei 40° bis auf etwa 100 ml eingengt, und der Fällungskörper wurde abgetrennt. Die Lösung wurde unterm Zusatz von Toluol im Cellophanmembran gegen Leitungswasser dialysiert. Die filtrierte Innen-Flüssigkeit wurde im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Ein braungefärbtes Pulver wurde in der Ausbeute von 0.9 g gewonnen. Gesamt-N (KJELDAHL)···17 mg Sbst. (lufttrocken): 5.90 ml N/70 H₂SO₄, 1.18 mg N, 6.94% N.

Protease aus vollem Blattgewebe (Präp.-II)—200 g des lufttrocknen Blattmaterials wurden unter Verteilung in 4 l Toluolwasser eine Woche lang bei Zimmertemperatur überlassen. Das Autolysat wurde abgepresst, der Rückstand wurde wiederum durch dieses Verfahren ausgezogen. Der Extrakt wurde bei 40° bis auf 30 ml eingengt, wobei sich ein Niederschlag in beträchtlicher Menge abschied. Das abfiltrierte Konzentrat wurde wie beim Präp.-I dialysiert und zur Trockenheit gebracht. Ausbeute betrug 0.2 g. Gesamt-N (KJELDAHL)···5 mg Sbst. (lufttrocken): 1.50 ml N/70 H₂SO₄, 0.3 mg N, 6.00% N.

Bestimmung der Enzymaktivität—In 1 ml Ansatz sind 10 mg Enzym und verschiedene Menge der Substrate nebst Salzmischungen als Puffer oder Aktivator enthalten. Toluol als Antiseptikum. Temp. 30°. Einwirkungsdauer 24 Std. Die COOH-Zunahme wurde durch Titrationsmethode bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. IV zusammengestellt. Die spezifische Aktivität der proteolytischen Wirkung, d. i. [P. E.]_{Nmg}, welche aus dem Wert der Gelatinespaltung (in Tab. IV) nach der Angabe von uns (6) umgerechnet wurde, ergab bei Präp.-I 1.06, und bei Präp.-II 1.10.

Literatur S. 111/112

TABELLE IV

Proteolytische Aktivität der aus Robinienblättern dargestellten Protease

Substrat: Menge in 1 ml Ansatz	Zusatz als Puffer od. Aktivator: mM pro 1 ml Ansatz	pH der Lösung	COOH-Zunahme durch Einw. von 10 mg Enzym nach 40 Std (ml 0.025 N KOH)	
			Präp.-I	Präp.-II
Gelatine: 60 mg	HCl: 0.10	2.6	0.00	0.00
"	0.05	3.6—4.0	0.60	0.50
"	0.02	4.4—4.6	1.00	0.80
"	—	6.0—6.2	2.20	2.00
"	NH ₄ OH: 0.025	7.0—6.6	1.90	1.60
"	0.05	7.8—7.0	1.40	1.00
"	0.10	8.8—7.6	1.00	0.90
"	HCN: 0.01	6.0—6.4	2.00	2.00
Pepton-Witte: 50 mg	—	6.4—6.0	1.10	1.25
"	HCN: 0.01	6.4—6.0	1.20	1.20
L-Leucylglycylglycin: 0.05 mM	NH ₄ OH: 0.05	7.0—6.6	0.45	1.10
L-Leucylglycin: 0.05 mM	NH ₄ OH: 0.10	7.8—7.4	0.00	1.00
	NH ₄ OH: 0.20			
Benzoylglycylglycin: 0.05 mM	HCN: 0.01	5.0	0.00	0.00
L-Asparagin: 0.05 mM	NH ₄ OH: 0.05	7.2—6.6	0.70	1.10

SCHLUSSBETRACHTUNG

Der Proteingehalt im Robinienblatt ist aufs engste mit seinem Entwicklungsstadium verbunden, so dass dessen Werte vom jungen Blatt bis zum alten zwischen 36–13% schwanken. In dem keimenden Blatt überwiegt ein Streckungswachstum, und infolgedessen zweifelsohne ist das Verhältnis des plasmatischen Inhaltes zu Cellulosewand nach und nach verkleinert. Das ist der Grund für die Proteinabnahme in den jungen Blättern. Aber dies ist nicht der Fall bei den alten Blättern. Hierbei scheint es sich allem Anscheine nach um eine echte Proteolyse zu handeln. Im Anschluss daran sei die Angabe von VICKERY *et al.* (7) zu erwähnen. Diese Autoren haben mittels der ¹⁵N-Isotopentechnik bei Tabakblättern darauf hingewiesen, dass das Blattprotein auch im normalen Zustande ständig einer Spaltung zu unterliegen bestimmt sei. Von diesem Gesichtspunkte aus könnte man wohl die von BORODIN und SCHULZE dargelegten Tatsachen auf richtigem Grundlage vollwürdigen.

Bei Erwägung dieser Umstände habe ich die Verhungerungsversuche mit Robinienblatt ausgeführt. Dabei hat es sich ergeben, dass das Protein der Blätter von verschiedenem Wachstumsstadium bei 6-tägiger Excision mit dem Spaltungsgrad von 10–13% aufgespalten wird. Ausserdem vermehrten sich der Amino-N und Amid-N beiderlei, und das Asparagin wurde

als ein Umwandlungsprodukt gewonnen. Um diesen Vorgang auf enzymologischem Wege zu verfolgen, habe ich dann die im Blattgewebe hervorgehende Autolyse zum näheren Studium herangezogen. Die Versuche ergaben, dass das Blattprotein mehr oder minder einer Selbstverdauung anheimfällt. Zahlenmässig angegeben, wurde der Spaltungsgrad auf 6.9–3.3%, niedriger gemäss der Alterung des Blattes geschätzt. Die Amino-N-Zunahme war deutlich, während keine Anhäufung des Amides beobachtet wurde. Als ein Abbauprodukt liess sich das Leucin in Nadelkristallen erhalten.

Aus den oben angeführten Tatsachen geht es klar hervor, dass mindestens die eigentliche Proteolyse im Blatt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* vonstatten geht. In Anbetracht dessen habe ich die Chloroplastensubstanz einerseits und das volle Blattgewebe andererseits zur Selbstdigestion unterworfen, um damit eine Proteinase darzustellen. Aus den beiden Autolysaten wurde je ein Enzympräparat in trockenem Zustand gewonnen. Das Enzym griff die Gelatine optimal bei pH 6.0 an, und spaltete auch das Pepton-Witte, während diese Wirkungen in Gegenwart des Cyanhydrins gar nicht gesteigert wurden. Die Versuche mit Polypeptiden und Asparagin ergaben, dass diese Enzympräparate noch nicht ganz frei von Leucylpeptidasen und Asparaginase sind.

LITERATUR

- (1) J. BORODIN. 1878. Über die physiologische Rolle und die Verbreitung des Asparagins im Pflanzenreiche. *Bot. Ztg.*, **36**, 802–816.
- (2) E. SCHULZE und E. BOSSHARD. 1885. Zur Kenntnis des Vorkommens von Allantoin, Asparagin, Hypoxanthin und Guanin in den Pflanzen. *Z. physiol. Chem.*, **9**, 420–444. E. SCHULZE. 1895. Über das Vorkommen von Glutamin in grünen Pflanzenteilen. *ibid.*, **20**, 327–334. E. SCHULZE. 1898–99. Über den Umsatz der Eiweissstoffe in der lebenden Pflanze. *ibid.*, **24**, 18–114; Über den Eiweissumsatz und die Bildungsweise des Asparagins und des Glutamins in den Pflanzen. *ibid.*, **26**, 411–426.
- (3) N. T. DELEANO. 1912. Untersuchungen über die in Weinblättern enthaltenen Kohlenhydrate und stickstoffhaltigen Körper. *Z. physiol. Chem.*, **80**, 79–94.
- (4) A. C. CHIBNALL. 1924. Investigation on the nitrogenous metabolism of the higher plants. VI. The rôle of asparagine in the metabolism of the mature plant. *Biochem. J.*, **18**, 395–404.
- (5) E. W. YEMM. 1937. Respiration of barley plant. III. Protein catabolism in starving leaves. *Proc. Roy. Soc. London*, **B 123**, 243–273; 1950. IV. Protein catabolism and the formation of amides in starving leaves. *ibid.*, **B 136**, 632–649.
- (6) Y. TAZAWA und T. HIROKAWA. 1962. Über den Proteinumsatz in den grünen Blättern. I. Darstellung des Leucins aus dem Autolysate der Blätter von *Raphanus sativus*. *Plant & Cell Physiol.*, **3**, 137–141; II. Darstellung von Leucin und Tyrosin aus dem Autolysate der Blätter von *Brassica campestris* var. *Toona*. *ibid.*, **3**, 143–147; 1963. III. Darstellung der Protease aus den

- Blättern von *Raphanus sativus* und *Brassica campestris* var. *Toona. ibid.*, 4, 95-102.
- (7) H. B. VICKERY, G. W. PUCHER, R. SCHOENHEIMER and D. RITTENBERG. 1940. The assimilation of ammonia nitrogen by the tobacco plants. A preliminary study with isotopic nitrogen. *J. Biol. Chem.*, 135, 531-539.