

Neue Amino- und Ketosäuren in grünen Pflanzen und die Biosynthese der Aminosäuren

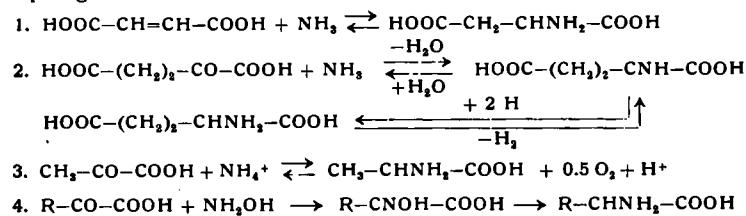
Von Prof. Dr. ARTTURI I. VIRTANEN, Helsinki*) Biochemisches Institut Helsinki

Der quantitativ wichtigste Syntheseweg der Pflanzen zu Aminosäuren verläuft über das Ammoniak, wenn auch dem Hydroxylamin als Zwischenprodukt der Nitrat-Reduktion eine wesentliche Rolle zufallen mag. Es ist gelungen, die Oxime der im Stoffwechsel zentralen α -Ketosäuren sowohl in Hefe als in grünen Pflanzen zu identifizieren. Eine unerwartete Anzahl neuer Aminosäuren wurde aus verschiedenen Pflanzen isoliert und strukturell aufgeklärt. Die entsprechenden neuen α -Ketosäuren wurden auch in den entsprechenden Pflanzen in den meisten Fällen gefunden, wodurch die experimentelle Begründung der Annahme vorhanden ist, daß diese Aminosäuren durch Transaminierung entstehen können. Die mit Hilfe moderner Untersuchungsmethoden (Austauscher, Papierchromatographie) in den letzten Jahren aus Pflanzen und Mikroorganismen isolierten Keto- und Aminosäuren werden beschrieben.

Grundlagen der Aminosäure-Synthese in Pflanzen

Während der letzten zwei Jahrzehnte hat unser Wissen über die Bildung der Baustoffe der Proteine, der Aminosäuren, in erster Linie dadurch eine zuverlässige Grundlage erhalten, daß Enzymsysteme entdeckt worden sind, welche sowohl bei der primären als auch bei der sekundären Synthese der Aminosäuren eine zentrale Rolle spielen. Bereits in den 1920er Jahren stellten *Quastel* und *Woolf*¹⁾ mit ruhenden *Coli*-Bakterien die Synthese von L-Asparaginsäure aus Fumarsäure und Ammoniak fest.

In unserem Laboratorium konnten wir das entsprechende Enzym, die Aspartase, aus *Pseudomonas fluorescens* in wäßriger Lösung erhalten²⁾. Das Enzym ist außerordentlich spezifisch und seine Funktion beschränkt sich ausschließlich auf die umkehrbare Reaktion:



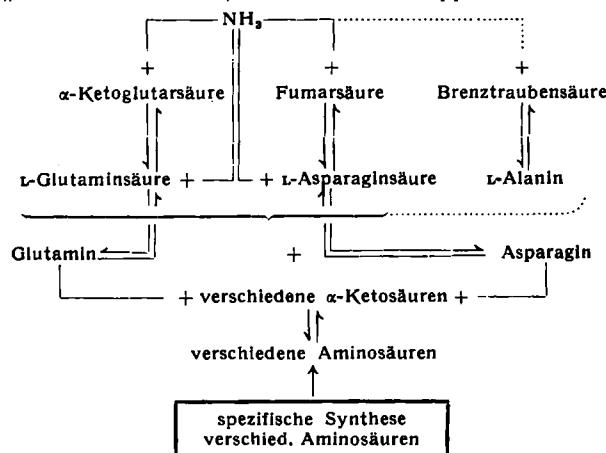
L-Asparaginsäure \rightleftharpoons Fumarsäure + NH₃ (Reaktion 1).

Dieses Enzym ist jedoch nicht in sämtlichen Organismen anzutreffen. Es scheint z. B. in tierischen Organismen gänzlich zu fehlen. In Mikroorganismen ist es ziemlich allgemein verbreitet und in höheren Pflanzen wird es ebenfalls angetroffen. Die in der zweiten Hälfte der 1930er Jahre von *von Euler und Adlers*³⁾ isolierte und charakterisierte Glutaminsäure-dehydrogenase, welche die oxydative Desaminierung der L-Glutaminsäure zu α -Ketoglutarsäure und-auch die umgekehrte Reaktion, die reduktive Aminierung der α -Ketoglutarsäure zu L-Glutaminsäure herbeiführt (Reaktion 2), hat sich in der belebten Natur als ein allgemeines Enzym erwiesen. Untersuchungen mit zahlreichen verschiedenen Organismen haben gezeigt, daß mit Ammoniumstickstoff als Stickstoff-Quelle zuerst L-Glutaminsäure in größeren Mengen gebildet wird. In ihr reichert sich bei möglichst kurzen Versuchszeiten mehr ^{15}N als in anderen Aminosäuren an, wenn ^{15}N -markierter Ammoniumstickstoff als Stickstoff-Nahrung benutzt wird. Andere Enzyme, die Aminosäuren aus Ammoniumstickstoff aufbauen können, sind nicht bekannt. Viele Umstände sprechen indessen für die Auffassung, daß auch α -Alanin aus Ammoniak und der entsprechenden Ketosäure, der Brenztraubensäure, entstehen kann (Reaktion 3). Nähre Angaben über diese Reaktion fehlen je-

doch. Werkman⁴⁾ ist der Ansicht, Phosphat sei an dieser Synthese beteiligt, womit die Reaktion dann andersartig als die entsprechende Biosynthese der Glutaminsäure wäre. Bei den von Roine⁵⁾ in unserem Laboratorium mit Stickstoff-armen *Torulopsis utilis*-Hefe ausgeführten Versuchen verlief die Synthese des Alanins aus Ammoniumstickstoff so rasch, daß es nicht leicht fällt, sie auf eine Transamierung zwischen Glutaminsäure und Brenztraubensäure zurückzuführen.

Silver und McElroy⁶⁾ haben kürzlich beobachtet, daß eine *Neurospora*-Mutante, welcher die Glutaminsäure-dehydrogenase fehlt, dessen ungeachtet mit Ammonium-stickstoff gleich gut wächst wie die Mutanten, welche dieses Enzym enthalten. Die Aminosäure-Synthese aus Ammoniumstickstoff muß demnach mit normaler Geschwindigkeit auch auf anderem Wege als über die Glutaminsäure stattfinden. Ob die Synthese hierbei über Asparaginsäure oder Alanin geht, ist noch nicht bekannt. Aus Arbeiten mit Mutanten dieser Art kann man wahrscheinlich wichtigen näheren Aufschluß über die primäre Bildung der Aminosäuren in den Zellen erwarten.

Glutaminsäure und Asparaginsäure sind zweifellos „Grundaminosäuren“, deren Amino-Gruppen direkt aus



* Nach einem Vortrag auf der Tagung der Nobelpreisträger der Chemie in Lindau 10.-16. Juli 1955. Das Thema wurde schon in Vorträgen vor den Chemischen Gesellschaften in Basel, Bern und Zürich Ende April und Anfang Mai 1955 behandelt.

¹⁾ J. H. Quastel u. B. Woolf, Biochem. J. 20, 545 [1926]; B. Woolf, ebenda 23, 472 [1929].
²⁾ A. I. Virtanen u. J. Tarnanen, Biochem. Z. 250, 13 [1932].

³⁾ H. v. Euler, E. Adler u. T. Steenhoff-Eriksen, Hoppe-Seylers Z.

physiol. Chem. 248, 227 [1937]; H. v. Euler, E. Adler, G. Günther, u. N. Das, ebenda 234, 61 [1938]; E. Adler, V. Hellström, G. Günther u. H. v. Euler, ebenda 255, 14 [1938].

⁴) C. H. Werkman, Report Agric. Res., Ames, Iowa 1948, 171.

⁵⁾ P. Roine, Suomalaisen Tiedeakatemian Toimituksia [Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A, II, Chem. No. 26] [1947].

⁴⁾ W. S. Silver u. W. D. McElroy, Arch. Biochem. Biophys. 51, 379 [1954].

Ammoniumstickstoff aufgebaut werden. Ob zu ihnen außer Alanin evtl. noch Glycin oder irgendeine andere Aminosäure gehören, ist noch unklar. Die meisten Aminosäuren werden auf alle Fälle direkt oder indirekt durch Vermittlung der „Grundaminosäuren“, also sekundär gebildet.

Neben Ammoniak ist auch die Möglichkeit besprochen worden, daß sich Hydroxylamin an der Aminosäure-Synthese, beteiligt (Reaktion 4), wenn Nitrat oder molekularer Stickstoff als Stickstoff-Nahrung dienen. Man hat jedenfalls bei gewissen Mikroorganismen festgestellt, daß bei der Reduktion des Nitrats zu Ammoniak wenigstens drei Reduktasen, die Nitrat-, Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktase nacheinander wirksam sind, womit das Hydroxylamin als Zwischenprodukt entsteht. Es sei in dieser Hinsicht besonders auf die Befunde von *Egami* und *Mitarbeitern*⁷⁾ verwiesen. Die meisten Forscher sind der Ansicht, daß das Hydroxylamin vollständig weiterreduziert wird, und daß auch mit Nitrat als Stickstoff-Nahrung erst der Ammoniumstickstoff an der Aminosäure-Synthese teilnimmt. Mit dieser Auffassung stehen die Beobachtungen nicht in vollem Einklang, denen zufolge Hydroxylamin in Kulturen von *Azotobacter* mit Nitrat oder molekularem Stickstoff als Stickstoff-Nahrung entstehen soll. *Blom*⁸⁾ teilte im Beginn der 1930er Jahre mit, daß er freies Hydroxylamin in *Azotobacter*-Kulturen bei Anwendung von molekularem Stickstoff als Stickstoff-Quelle gefunden habe. Einige Jahre später beobachtete *Endres*⁹⁾ die Bildung von gebundenem Hydroxylamin beim Kultivieren von *Azotobacter* sowohl mit Nitrat als molekularem Stickstoff als Stickstoff-Nahrung. Dagegen fand er kein freies Hydroxylamin, dessen Bildung er auch als Zwischenprodukt ablehnte. *Endres* war der Ansicht, daß das „gebundene Hydroxylamin“ Oximen angehört, da aus dieser Stickstoff-Fraktion durch Säurehydrolyse und anschließende Oxydation mit Jod Nitrit entstand. Solches entsteht in dessen auch aus Hydroxamsäuren, deren enzymatische Bildung aus Hydroxylamin und organischen Säuren bzw. deren Amiden später festgestellt worden ist¹⁰⁾. Somit wird der Charakter des gebundenen Hydroxylamins durch die Bildung von Nitrit nicht gelöst.

In unserem Laboratorium wurde gebundenes Hydroxylamin sowohl in grünen Pflanzen und in *Torulopsis*-Hefe mit Nitrat als Stickstoff-Nahrung als auch als Sekretionsprodukt der geimpften Leguminosen gefunden¹¹⁾. Zusammen mit *Csáky*¹²⁾ beobachteten wir das rasche Erscheinen von gebundenem Hydroxylamin in gelüfteter, Nitrat-haltiger Suspension von *Torulopsis*. Nach Erreichen eines Maximums nimmt dessen Menge wieder ab (Bild 1). Demgemäß hat es den Anschein als ob eine Adaptation zur Verwertung von gebundenem oder freiem Hydroxylamin stattfände.

Die Bestimmung des gebundenen Hydroxylamins beruht auf einem indirekten Analyseverfahren. Wir waren daher bestrebt zu ermitteln, wie das Hydroxylamin gebunden ist. Schon vor dem Kriege haben wir eine Stickstoff-Fraktion, die gebundenes Hydroxylamin enthielt, aus dem Nährboden von geimpften Erbsen mit Wurzelknöllchen isoliert. Da durch Reduktion Asparaginsäure ent-

stand¹³⁾, hätte die Fraktion damit das Oxim der Oxalsägsäure enthalten. Später ist es uns nicht mehr gelungen entsprechende Stickstoff-Fraktionen zu isolieren. Da aber die chromatographischen Verfahren heute neue Möglichkeiten bieten, ist in unserem Laboratorium erneut die Untersuchung des gebundenen Hydroxylamins in Angriff genommen worden. Zugabe von Nitrit zur gelüfteten Wassersuspension von *Torulopsis* lieferte nach etwa 25 min ein

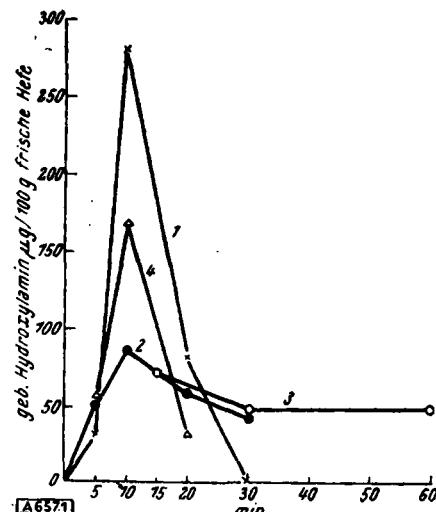


Bild 1

Bildung von gebundenem Hydroxylamin in stark belüfteter Suspension von *Torulopsis*-Hefe mit Nitrat als N-Nahrung. Kurven 1–3 mit „niedrig-N-Hefe“, Kurve 4 mit „normal-N-Hefe“

Maximum an gebundenem Hydroxylamin. Der Versuch wurde dann unterbrochen, die Hefe abzentrifugiert, in 96 proz. Alkohol suspendiert, die Fettsubstanzen mit Amylalkohol entfernt und die Aminosäuren mit Dowex-50-Harz beseitigt. Da der direkte papierchromatographische Nachweis der Hydroxylamin-Verbindungen sich als schwierig erwies, wurde die NOH-Gruppe mit Natrium-Amalgam zur Amino-Gruppe reduziert. Als Kontrolle diente die gleiche Menge nichtreduzierten Extraks. Auf diese Weise konnten wir¹⁴⁾ in *Torulopsis*-Hefe mit Nitrit als Stickstoff-Nahrung die Bildung der Oxime von Brenztraubensäure, α -Ketoglutarsäure, Oxalessigsäure und Glyoxylsäure nachweisen (Bild 2).

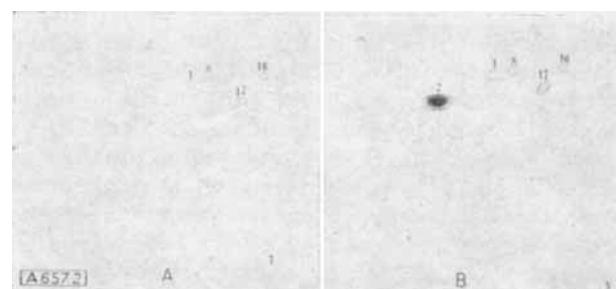


Bild 2

Zweidimensionales Papierchromatogramm von *Torulopsis utilis*-Suspension in Nitrit-haltiger Lösung. Lösungsmittel: Butanol-Essigsäure-Wasser und Phenol-Wasser in NH_3 -Atmosphäre. A: Nach Separierung der Aminosäuren und vor der Reduktion; Spuren von Aminosäuren 1, 8, 16 und 17 zurückgeblieben. B: Wie A, aber nach der Reduktion. 1 = Gly, 2 = Ala, 8 = Ser, 16 = Asp, 17 = Glu

In der Dowex-Säule verblieben nur ca. 10% des gebundenen Hydroxylamins. Diese Fraktion kann z. B. die Hydroxamsäuren der Asparagin- und Glutaminsäure ent-

⁷⁾ S. Taniguchi, H. Mitsui, J. Toyoda, T. Yamada u. F. Egami, J. Biochem. 40, 175 [1953].

⁸⁾ J. Blom, Zbl. Bakteriol. Parasitenkunde, Infektionskrankh. Abt. II, 84, 60 [1931].

⁹⁾ G. Endres, Liebigs Ann. Chem. 518, 109 [1935]; G. Endres u. L. Kaufmann, ebenda 530, 184 [1937]; 535, 1 [1938].

¹⁰⁾ J. F. Speck, J. biol. Chemistry 168, 403 [1937].

¹¹⁾ A. I. Virtanen u. T. Laine, Nature [London] 141, 748 [1938]; A. I. Virtanen u. A. A. Arhimo, Suomen Kemistilehti B 12, 24 [1939].

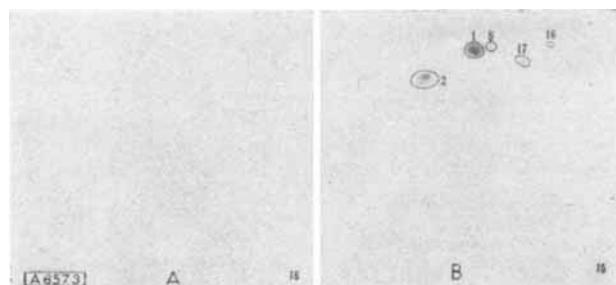
¹²⁾ A. I. Virtanen u. T. Csáky, Nature [London] 161, 814 [1948].

¹³⁾ A. I. Virtanen u. T. Laine, Biochem. J. 33, 412 [1939].

¹⁴⁾ A. I. Virtanen u. N.-E. Saris, Acta Chem. Scand. 9, 337 [1955]; bzw. unpubliziert.

halten. Die Fraktion, die nur ganz minimale Mengen gebundenes Hydroxylamin enthielt, ist vorläufig nicht näher untersucht worden.

Auch in den Wurzeln junger Haferpflanzen, welche in Nitrat- und Nitrit-haltiger Nährlösung wuchsen, haben wir¹⁴⁾ die Bildung von Oximen der Glyoxylsäure, Brenztraubensäure, α -Ketoglutarsäure, Oxalegissäure und Oxybrenztraubensäure festgestellt (Bild 3).



tiger Faktor bezüglich der Regelung der Mengenverhältnisse der verschiedenen Aminosäuren und Ketosäuren untereinander herausgestellt. Sie macht auch die Beteiligung solcher Aminosäuren am Stickstoff-Stoffwechsel möglich, die nicht zu den allgemein in den Zellen vorkommenden Stickstoff-Verbindungen gehören. Der mehrjährige Disput über die Frage, ob sich die Transaminierung lediglich auf einige wenige Amino- bzw. Ketosäuren beschränkt oder ob ihr eine ausgedehntere Bedeutung zukommt, hat insbesondere nach Einführung der Papierchromatographie eine geradezu überraschende Lösung gefunden. Die Reaktion hat sich als dermaßen allgemein erwiesen, daß sich ihr Wirkungsbereich sogar über die α -Aminosäuren hinaus erstreckt. Z. B. hat man festgestellt, daß sich β -Alanin und γ -Aminobuttersäure an der Transaminierung beteiligen^{21, 22}) Außer der Transaminierung sind die oxydative Desaminierung und die Decarboxylierung der Aminodicarbonsäuren Reaktionen, welche die Verhältnisse der Aminosäuren untereinander beeinflussen.

Neue Ketosäuren aus Pflanzen

Das Ermessen der Bedeutung der Transaminierung im Stickstoff-Stoffwechsel der Zellen ist durch den Umstand erschwert worden, daß es bis in allerletzte Zeit nicht bekannt war, ob in den Organismen die den verschiedenen Aminosäuren entsprechenden Ketosäuren vorhanden sind. Nur die zentralen Ketosäuren: Brenztraubensäure, Oxalessigsäure und α -Ketoglutarsäure waren im tierischen Organismus gefunden worden. Ihr Nachweis in grünen Pflanzen gelang in unserem Laboratorium gegen Ende der 1930er Jahre²³). Erst die chromatographische und speziell die papierchromatographische Methodik hat zur Entdeckung zahlreicher anderer Ketosäuren geführt. Die Versuche, diese Säuren auf dem Papierchromatogramm in Form ihrer Dinitrophenylhydrazone zu identifizieren, bestätigten zunächst lediglich das Vorhandensein der erwähnten zentralen Ketosäuren in Pflanzen²⁴). Neue Ketosäuren wurden aber vor allem deshalb nicht gefunden, weil die Hydrazone ein und derselben Ketosäure zwei Isomere und entsprechend zwei Flecken bilden, was die Feststellung mehrerer Ketosäuren gleichzeitig erschwert. Erst nachdem man dazu überging, die Ketosäurehydrazone zu den entsprechenden Aminosäuren zu reduzieren und sie selbst papierchromatographisch zu identifizieren, gelangen Nachweis und Identifizierung zahlreicher neuer Ketosäuren. *Tafel*²⁵) wies bereits 1886 nach, daß die Hydrazone mit Natriumamalgam zu ihrer Aminosäure reduziert werden, doch hat man erst etwa während der beiden letzten Jahre begonnen dieses Prinzip auf die Identifizierung der Ketosäuren in biologischer Materie anzuwenden. Wir haben die Dinitrophenylhydrazone mit Zinn und Salzsäure reduziert²⁶) und in verschiedenen Pflanzen bisher außer der regelmäßig darin vorhandenen Brenztraubensäure, Oxalessigsäure, α -Ketoglutarsäure und Glyoxylsäure folgende neue Ketosäuren²⁷) nachweisen können (entspr. Aminosäuren):

α -Keto adipinsäure
 $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-COOH}^{\text{b}}$ (Amino adipinsäure)
 α -Ketopimelinsäure
 $\text{HOOC-CH}_3\text{-CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_3\text{-CO-COOH}^{\text{b}}$ (Aminopimelinsäure)

a) Keimende Erbsensaat. b) *Asplenium septentrionale*.

²¹) S. P. Bessman, J. Rossen u. E. C. Layne, *J. biol. Chemistry* 201, 385 [1953].

²²) J. K. Miettinen u. A. I. Virtanen, *Acta chem. Scand.* 7, 1243 [1953].

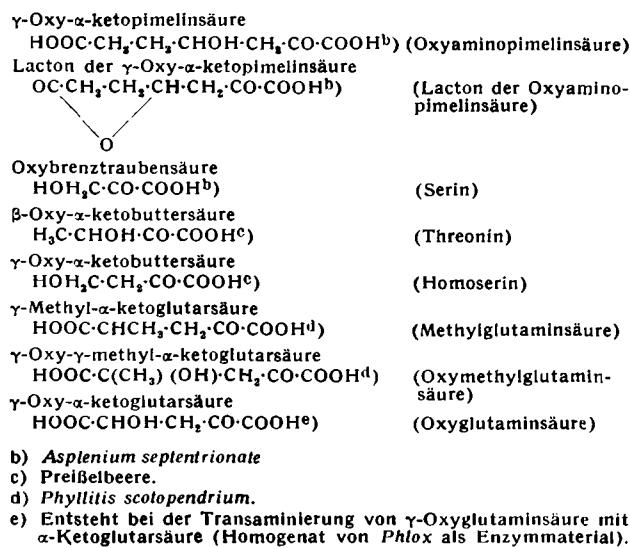
²³) A. I. Virtanen u. T. Laine, *Suomen Kemistilehti* B 10, 35 [1937]; A. I. Virtanen u. A. A. Arhimo, *Nature* [London] 144, 36 [1939]; A. I. Virtanen, A. A. Arhimo, J. Sundman u. L. Järnes, *J. makromolekulare Chem.* 162, 716 [1943].

²⁴) A. I. Virtanen, J. K. Miettinen u. H. Kunttu, *Acta chem. Scand.* 7, 38 [1953].

²⁵) J. Tafel, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 19, 2415 [1886].

²⁶) M. Alifthan u. A. I. Virtanen, *Acta chem. Scand.* 9, 186 [1955].

²⁷) A. I. Virtanen u. M. Alifthan, ebenda 8, 1720 [1954]; 9, 188 [1955].



Ferner sind in unserem Laboratorium zwei Ketosäuren in pflanzlichem Material festgestellt worden, die vorläufig nicht identifiziert werden konnten. Die meisten dieser neuen Ketosäuren sind in denselben Pflanzen zu finden in denen auch die entsprechenden Aminosäuren vorkommen (s. unten). *Towers* und *Steward*²⁸), *Fowden* und *Webb*²⁹) haben der interessanten γ -Methylen-glutaminsäure entsprechende γ -Methylen- α -ketoglutarsäure in *Tulipa* bzw. *Arachis* identifiziert. *Towers*, *Thompson* und *Steward*^{28a}) konnten auch die Ketosäure, welche Valin entspricht, in grünen Pflanzen finden. *Steward* hat mit seinen Mitarbeitern wertvolle Pionierarbeiten bezüglich des Vorkommens von Amino- und Ketosäuren in grünen Pflanzen ausgeführt.

Auf Grund dieser Befunde ist es offenbar, daß in den Pflanzen eine große Anzahl α -Ketosäuren, welche verschiedenen Aminosäuren entsprechen, vorhanden sind. Damit ist die experimentelle Begründung der Annahme gewonnen, daß die verschiedenen Aminosäuren in Organismen durch Transaminierung aus den entsprechenden Ketosäuren entstehen können. Sofern die Ketosäure „primär“, d. h. auf anderem Wege als aus der entsprechenden Aminosäure entstanden ist, wird die Ergründung ihres Bildungsmechanismus zugleich Klarheit über die Biosynthese der Aminosäure ergeben. Selbstverständlich ist es möglich, daß eine Ketosäure ausschließlich aus der entsprechenden Aminosäure durch Transaminierung oder Desaminierung entsteht. In diesem Fall ist die Ketosäure ein „sekundäres“ Produkt, dessen Anwesenheit keinerlei Aufschluß über die „primäre“ Synthese der betr. Aminosäure liefert, obwohl sich auch in diesem Fall die Aminosäure wieder aus der Ketosäure bilden kann, wenn sich die Konzentrationsverhältnisse in einer für die Aminosäure-Synthese günstigen Richtung verschieben (Bild 4). Die Gleichgewichtsbeziehungen zwischen den zahlreichen verschiedenen Keto- und Aminosäuren in den Zellen sind außerordentlich kompliziert, da sie in entscheidender Weise von der jeweiligen Konzentration dieser Säuren und von der Aktivität der verschiedenen Transaminasen abhängen. Auf die Konzentration der Proteinaminosäuren ist die Proteinsynthese von starkem Einfluß, auf die der Nicht-Proteinaminosäuren wiederum deren Verbrauch zu anderen Reaktionen, zur Desaminierung und, wenn es sich um Dicarbonsäuren handelt, zur Decarboxylierung. Auf alle Fälle hat der

²⁸) G. H. N. Towers u. F. C. Steward, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 1959 [1954]; L. Fowden u. J. A. Webb, *Biochem. J.* 59, 228 [1955].

²⁹) G. H. N. Towers, J. F. Thompson u. F. C. Steward, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 2392 [1954].

Nachweis zahlreicher neuer Ketosäuren in Pflanzen neue Perspektiven sowohl in Bezug auf den Kohlenstoff- als auf den Stickstoff-Stoffwechsel eröffnet.

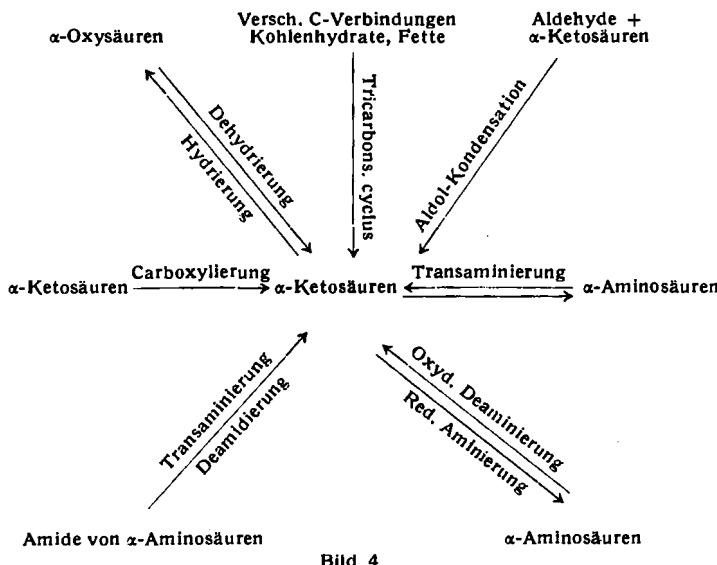


Bild 4

Wege zur Synthese von α -Ketosäuren

Neue Aminosäuren aus Pflanzen

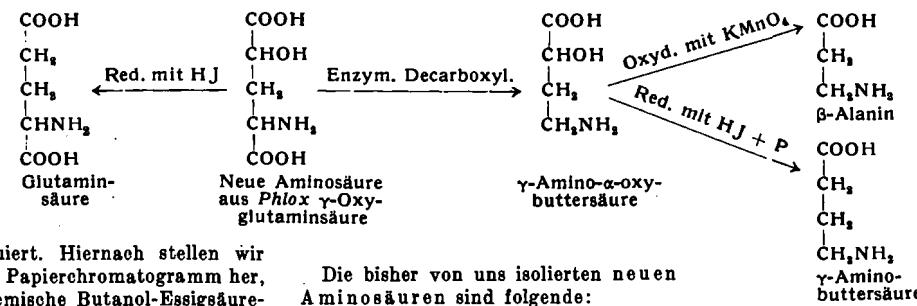
Neue Aminosäuren sind innerhalb einiger letztvergangener Jahre besonders in grünen Pflanzen in überraschender Anzahl gefunden worden. Zumeist sind es Nicht-Proteinaminosäuren, doch sind auch einige in Proteinen anzutreffende darunter. Insbesondere in höheren Pflanzen trifft man unbekannte freie Aminosäuren und zugleich oft die entsprechenden Ketosäuren unerwartet in den verschiedensten Familien und Arten.

Da in unserem Laboratorium im Verlaufe einiger Jahre etwa zehn neue Aminosäuren gefunden, isoliert und strukturell aufgeklärt worden sind, sei das angewandte Verfahren kurz umrissen. Zur Isolierung der freien Aminosäuren wird das Pflanzenmaterial homogenisiert und mit 70proz. Alkohol extrahiert. Außer den Aminosäuren gehen dabei zahlreiche andere organische Verbindungen und Mineralsalze in Lösung. Um die Aminosäuren vom größten Teil dieser Stoffe abzutrennen, lassen wir die Lösung durch Amberlite IR 120-Säule rinnen. Die in der Säule verbliebenen Aminosäuren und überdies eine gewisse Menge niedermolekularer Peptide werden mit 1 n Ammoniak eluiert. Hiernach stellen wir von der Lösung ein zweidimensionales Papierchromatogramm her, wobei meist als Lösungsmittel die Gemische Butanol-Essigsäure-Wasser und Phenol-Wasser in NH_3 -Atmosphäre benutzt werden. Wird in dem Chromatogramm nach Ninhydrin-Behandlung irgend ein unbekannter Fleck gefunden, so wird zuerst geprüft, ob er leicht oder schwer durch Säure hydrolysiert wird und ob er bei der Papierelektrophorese sauer, neutral oder basisch reagiert. Handelt es sich um eine neutrale Aminosäure, so trennen wir mit einem geeigneten Ionenaustauschharz, z. B. in der Amberlite IR-4B-Säule, die sauren Aminosäuren ab und fraktionieren dann nach Stein und Moor in der Dowex-50-Säule die in der Lösung verbliebenen Aminosäuren. Mit dieser Methode sind von Miettinen, Kari, Moisio, Alftan und Virtanen²⁹⁾ L-Homoserin und von Virtanen und Kari^{30, 31)} die 4- und 5-Oxypiperidin-2-carboxylsäuren rein isoliert worden. Die Isolierung der beiden letzteren in reinem Zustand gelang auch dann, wenn sie beide in der gleichen Pflanze (*Acacia pentadena*) vorkamen. Die Isolierungen wurden dadurch bedeutend erleichtert, daß man die α -Aminosäuren mit Stickstoffoxyden zuerst desaminieren konnte, so daß nur die stabilen, se-

kundären Aminosäuren zurückblieben. Dieses Verfahren hat sich beim Isolieren sekundärer Aminosäuren außerordentlich gut bewährt.

Wenn neue Amino-dicarbonsäuren von den üblichen zu trennen sind, gelingt die Fraktionierung mit einem Ionenaustauschharz oft nicht. Man muß sich dann mit verschiedenen Mitteln behelfen. Die γ -Oxyglutaminsäure³²⁾ konnte aus *Phlox decussata* durch Auftrennen der die sauren Aminosäuren enthaltenden Fraktion in der Cellulose-Säule rein isoliert werden. Die α -Aminopimelinsäure^{33, 34)}, von der wir sehr geringe Mengen in zwei so weit verschiedenen Pflanzen wie in dem kleinen Felsenfarn *Asplenium septentrionale* und in den Samen des Johannes-Brotbaumes, *Ceratonia siliqua*, gefunden haben, konnte rein isoliert werden durch Ausschneiden der betreffenden Stelle des ein-dimensionalen, mit Ninhydrin nicht behandelten Papierchromatogramms und Extrahieren des Papierstreifens mit Wasser. Die Isolierung der γ -Oxy- α -aminopimelinsäure durch Virtanen, Uksila und Matikkala³⁵⁾ erforderte eine besondere Methode. Diese in *Asplenium*-Arten vorkommende Amino-dicarbonsäure ist die einzige bisher bekannte Aminosäure, deren Lacton auch in der Pflanze vorhanden ist. Die Säure wurde zuerst mit den anderen Amino-dicarbonsäuren von den neutralen und basischen Aminosäuren mittels Amberlite-IR 120 befreit, die Fraktion der sauren Aminosäuren mit Salzsäure erhitzt, wobei die γ -Oxysäure gänzlich in das Lacton überging und das neutrale Lacton dann von den sauren Aminosäuren in der Amberlite IR-4B-Säule getrennt. Das reine Lacton konnte durch Erhitzen in Natriumcarbonat-Lösung in die entsprechende Amino-dicarbonsäure übergeführt werden.

Die Strukturbestimmungen der Aminosäuren können in diesem Zusammenhang nicht ausführlich behandelt werden. Es sei auf unsere einschlägigen Veröffentlichungen verwiesen. Meist können im Laboratorium nur sehr geringe Mengen der Amino- und Ketosäuren isoliert werden, oft nur einige Milligramm. Die sehr empfindlichen papierchromatographischen Mikromethoden und oftmals auch enzymatische Methoden sind deshalb für die Strukturbestimmungen von hohem Wert. Als Beispiel sei unsere Strukturbestimmung der γ -Oxyglutaminsäure genannt^{32, 37)}. Durch Reduktion mit Jodwasserstoff und rotem Phosphor wurde zuerst papierchromatographisch die Bildung von Glutaminsäure bewiesen. Um die Stellung der Hydroxyl-Gruppe festzulegen, haben wir dann die unbekannte Oxyglutaminsäure mit *E. coli* decarboxyliert. Als Produkt der Decarboxylierung konnte papierchromatographisch γ -Amino- α -oxybuttersäure identifiziert werden. Ihre Oxydation mit Kaliumpermanganat in saurer Lösung ergab β -Alanin, welches auch papierchromatographisch identifiziert wurde. Die Struktur des Decarboxylierungsproduktes war somit sichergestellt. Mit sehr kleinen Substanzmengen gelang so die Strukturbestimmung der γ -Oxyglutaminsäure.



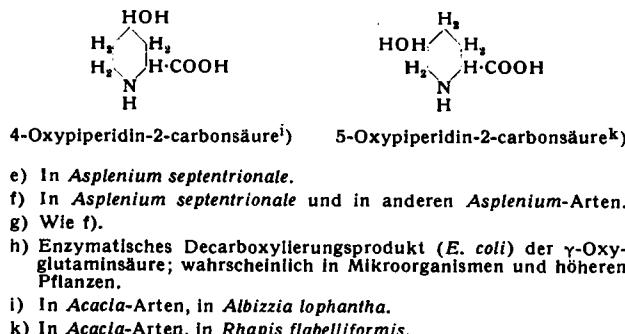
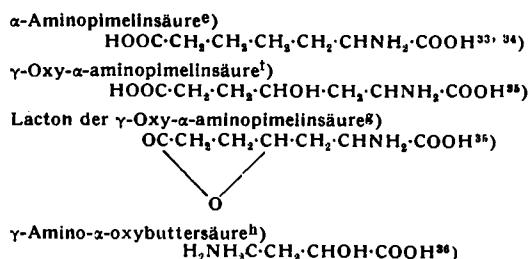
Die bisher von uns isolierten neuen Aminosäuren sind folgende:

- Homoserin^{a)} $\text{HOH}_2\text{C}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CHNH}_2\cdot\text{COOH}^{38)}$
 γ -Methylglutaminsäure^{b)} $\text{HOOC}\cdot\text{CHCH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CHNH}_2\cdot\text{COOH}^{37)}$
 γ -Oxyglutaminsäure^{c)} $\text{HOOC}\cdot\text{CHOH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CHNH}_2\cdot\text{COOH}^{32, 36)}$
 γ -Methyl- γ -oxyglutaminsäure^{d)} $\text{HOOC}\cdot\text{C}(\text{OH})\cdot(\text{CH}_2)\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CHNH}_2\cdot\text{COOH}^{27, 38)}$

- a) Zuerst in Erbsenpflanzen (*Pisum*), dann in vielen anderen Pflanzen.
b) In *Phyllitis scolopendrium*-Farn.
c) In *Phlox decussata*.
d) In *Phyllitis scolopendrium* (von Steward aus *Adiantum*-Farn isoliert und als der Erste mit synthetischer γ -Methyl- γ -oxyglutaminsäure identifiziert; briefliche Mitteilung, 23. Febr. 1955).

- ³²⁾ A. I. Virtanen u. P. K. Hietala, ebenda 9, 175 [1955].
³³⁾ A. I. Virtanen u. A.-M. Berg, ebenda 8, 1085 [1954].
³⁴⁾ A.-M. Berg u. A. I. Virtanen, Acta chem. Scand. 8, 1725 [1954].
³⁵⁾ A. I. Virtanen, E. Uksila u. E. J. Matikkala, ebenda 8, 1091 [1954].
³⁶⁾ A. I. Virtanen u. P. K. Hietala, ebenda 9, 549 [1955].
³⁷⁾ A. I. Virtanen u. A.-M. Berg, ebenda 9, 553 [1955].
³⁸⁾ N. Grobelaar, J. K. Pollard u. F. C. Steward, Nature [London] 175, 703 [1955].

²⁹⁾ J. K. Miettinen, S. Kari, T. Moisio, M. Alftan u. A. I. Virtanen, Suomen Kemistilehti B 26, 26 [1953].
³⁰⁾ A. I. Virtanen u. S. Kari, Acta chem. Scand. 9, 170 [1955].
³¹⁾ A. I. Virtanen u. S. Kari, ebenda 8, 1290 [1954].



Alle anderen außer der γ -Oxyglutaminsäure und dem Homoserin (s. unten) sind wenigstens vorläufig nur als freie Aminosäuren in Pflanzen angetroffen worden. Die γ -Oxyglutaminsäure findet sich in *Phlox* sowohl frei als auch im Proteinanteil. Es ist nicht unmöglich, daß irgendeine andere bis auf weiteres nur frei angetroffene Aminosäure in einem Protein gefunden werden könnte. Falls sie in einem in der Pflanze in geringer Menge vorkommenden Protein auftritt, so ist ihr Nachweis im Proteinteil schwierig.

Von den neuen Aminosäuren sind die meisten früher nie in Pflanzen oder Tierorganismen gefunden worden. Nur das Vorkommen von Homoserin wurde von *Fling* und *Horowitz*^{38a} in einer *Neurospora*-Mutante bewiesen. Das Homoserin konnte jedoch bei dieser Arbeit nicht rein isoliert werden.

Die Lage der Flecke unserer neuen Aminosäuren im zweidimensionalen Papierchromatogramm zeigt Bild 5.

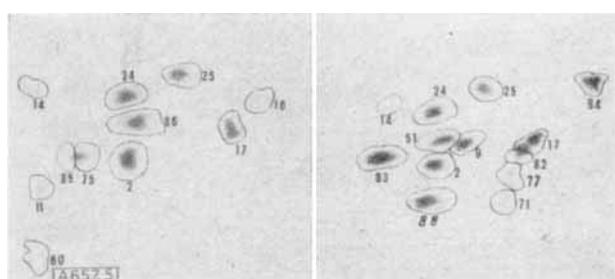


Bild 5

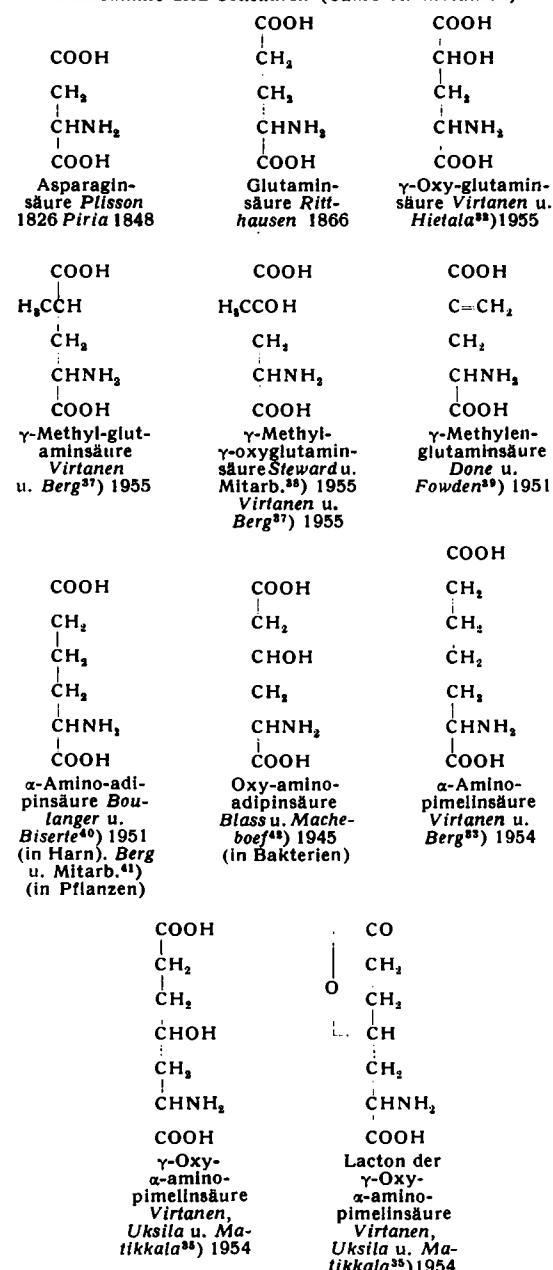
Zweidimensionales Papierchromatogramm der neuen Aminosäuren. Zur Orientierung sind mehrere früher bekannte Aminosäuren der Aminosäure-Mischung zugesetzt worden. Lösungsmittel: Butanol-Essigsäure:Wasser (63:27:10) und Phenol-Wasser in NH_3 -Atmosphäre. 2 = Ala, 11 = Pro, 14 = Arg., 16 = Asp., 17 = Glu., 24 = Glu.-NH₂, 25 = Asp.-NH₂, 51 = Homoserin, 60 = Pipcolösäure, 71 = α -Aminopimelinsäure, 75 = γ -Oxypipcolösäure, 77 = γ -Methylglutaminsäure, 79 = γ -Methylenglutaminsäure, 82 = γ -Oxy- α -aminopimelinsäure, 84 = γ -Oxyglutaminsäure, 85 = 4-Oxypipcolösäure, 86 = α -Oxy- γ -aminobuttersäure, 88 = α -Aminosäure isoliert aus Preißelbeeren; Struktur noch nicht sichergestellt. γ -Methyl- γ -oxyglutaminsäure fehlt im Chromatogramm, sie liegt zwischen 16 und 17³⁷).

Die Übersicht deutet bereits an, welche unerwartete Menge neuer Aminosäuren in der Pflanzenwelt insgesamt vorhanden sein muß. Wenn wir nur einige Aminosäure-Gruppen unter Berücksichtigung der durch andere For-

^{38a)} M. Fling u. N. H. Horowitz, J. biol. Chemistry 190, 277 [1951].

scher gefundenen neuen Aminosäuren näher betrachten, erhalten wir ein anschauliches Bild von diesem Sachverhalt.

Monoamino-dicarbonsäuren (Saure Aminosäuren)



Neben die „Grundaminosäuren“ Asparagin- und Glutaminsäure sind somit in diesem Jahrzehnt acht bzw. neun neue Amino-dicarbonsäuren getreten. Von diesen kommen wenigstens γ -Oxyglutaminsäure und α -Amino adipinsäure sowohl frei als auch in Proteinen vor.

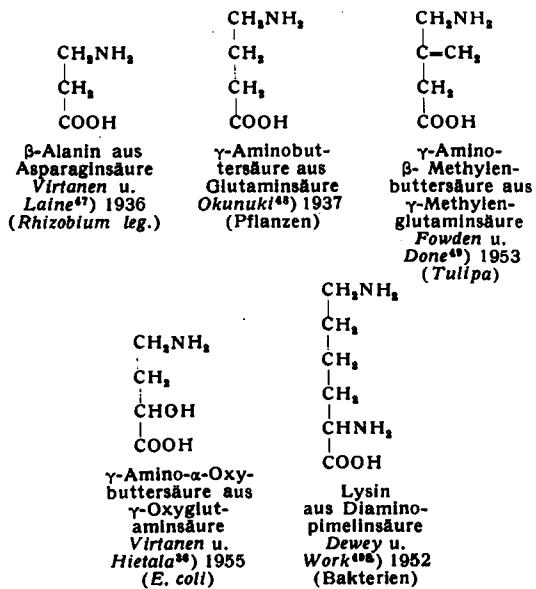
In den Lehrbüchern der Chemie wird noch oft als Proteinaminosäure β -Oxyglutaminsäure erwähnt. Der Befund dieser Aminosäure vor mehr als 30 Jahren (Dakin) hat sich später nicht bestätigen lassen. Das Originalpräparat hat sich vielmehr als eine Mischung von üblichen Aminosäuren, hauptsächlich von Glutamin- und Asparaginsäure, erwiesen⁴⁵.

- ³⁸ J. Done u. L. Fowden, Biochem. J. 49, Proc. XX [1951]; 51, 451 [1952].
⁴⁰ P. Boulanger u. G. Biserte, C. R. hebdo. Séances Acad. Sci. 232, 1451 [1951].
⁴¹ A.-M. Berg, S. Kari, M. Alftan u. A. I. Virtanen, Acta chem. Scand. 8, 358 [1954].
⁴² J. Blass u. M. Macheboef, C. R. hebdo. Séances Acad. Sci. 227, 313 [1945]; Helv. chim. Acta 29, 1315 [1945].
⁴³ E. Work, Nature [London] 165, 74 [1950].
⁴⁴ E. Work, u. D. L. Dewey, J. gen. Microbiol. 9, 394 [1953]; Proc. 6. Int. Congr. Microbiol. Roma 1953.
⁴⁵ C. E. Dent u. D. J. Fowler, Biochem. J. 56, 54 [1954].

Betrachtet man die Strukturen der neuen Glutaminsäure-Derivate, so ist es interessant festzustellen, daß bei den bisher in der Natur gefundenen Derivaten die verschiedenen Substituenten, die Hydroxyl-, Methyl- und Méthylen-Gruppen, stets mit dem γ -Kohlenstoffatom verbunden sind. Dies kann mit der Bildungsweise dieser Aminosäuren zusammenhängen, über die jedoch noch keine experimentellen Angaben vorliegen. Insofern keine β -Derivate der Glutaminsäure in der Natur vorhanden sind, wären von der Glutaminsäure bereits praktisch alle möglichen Hydroxyl-, Methyl- oder Methylen-Derivate bekannt. γ -Derivate anderer Art sind dagegen möglich. Von der α -Aminoadipinsäure ist nur ein Oxy-Derivat von unbekannter Konstitution bekannt, weil die Stellung sowohl der Hydroxyl- als der Amino-Gruppe der Oxyaminoacidinsäure von *Blass* und *Macheboef*⁴³) nicht sichergestellt ist. Im Harn der Kuh haben wir regelmäßig α -Aminoadipinsäure gefunden, zum Teil auch in gebundener Form. Ob es sich hierbei um Peptide oder Verbindungen mit Kohlehydraten handelt, ist nicht näher untersucht worden. Es ist möglich, daß die in Kuhharn gefundene α -Aminoadipinsäure aus dem Futter stammt, da diese Aminosäure ziemlich allgemein in grünen Pflanzen verbreitet ist⁴¹). Von den Derivaten der α -Aminopimelinsäure sind vorläufig nur das beschriebene γ -Hydroxy-Derivat und dessen Lacton bekannt. Es ist aber anzunehmen, daß in biologischem Material noch weitere Derivate entdeckt werden. Eine Kette mit mehr als sieben Kohlenstoffatomen ist bisher in den Aminosäuren nicht gefunden worden. Es bleibt zu erwähnen, daß *Work*^{43, 44}) in den Proteinen zahlreicher Bakterien die neutrale α -, ϵ -Diaminopimelinsäure gefunden hat, und daß *Woolley, Schaffner* und *Braun*⁴⁵) in einem Bakterien-toxin das β -Oxyderivat dieser Säure ermittelten.

Decarboxylierungsprodukte der Aminodicarbon-säuren

Aus Asparaginsäure, Glutaminsäure und einigen in Pflanzen gefundenen γ -Derivaten der letzteren wird durch Einwirkung spezifischer Aminosäure-Decarboxylasen die α -Carboxyl-Gruppe als Kohlendioxyd abgespalten. Folgende Decarboxylierungsprodukte der in der Natur vorkommenden Aminodicarbonsäuren sind bekannt:

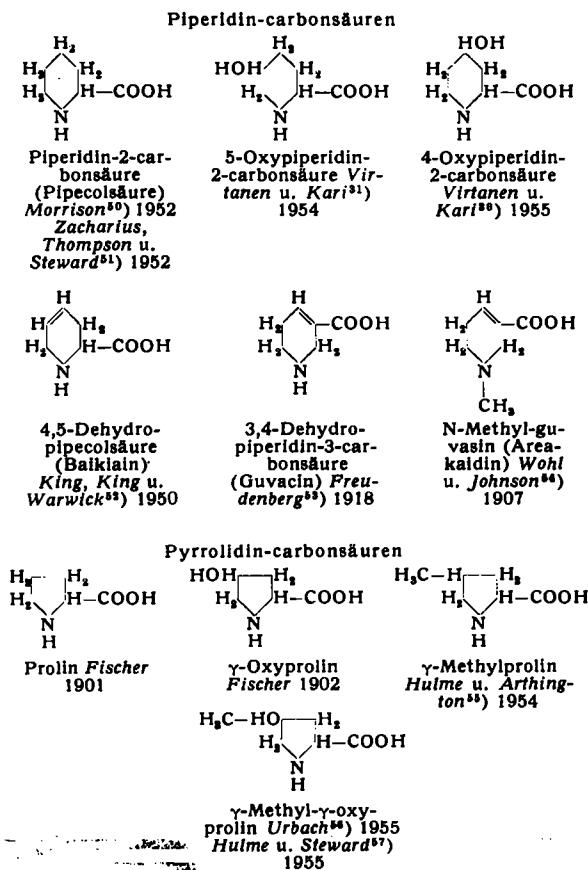


⁴⁴) *D. W. Woolley, G. Schaffner u. A. C. Braun, J. biol. Chemistry* **198**, 807 [1952].
⁴⁵) *A. I. Virtanen u. T. Laine, Suomen Kemistilehti B* **10**, 2 [1937]; *Enzymologia* [Den Haag] **3**, 266 [1937].
⁴⁶) *K. Okukuni, Bot. Mag. [Tokyo]* **51**, 270 [1937].
⁴⁷) *L. Fowden u. G. Done, Nature [London]* **171**, 1068 [1953].
⁴⁸) *D. I. Davies u. F. Work, shenda* **160**, 533 [1952].

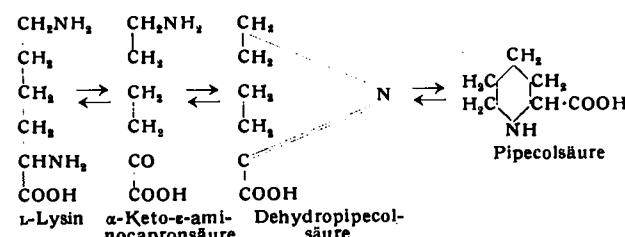
Es ist jedoch garnicht sicher, daß z. B. β -Alanin und γ -Aminobuttersäure, welche allgemein als freie Aminosäuren in Pflanzen und Mikroorganismen vorkommen, stets durch Decarboxylierung entstanden sind. Auch andere Entstehungsmöglichkeiten sind hier denkbar. Die Aminosäure-Decarboxylasen sind in bedeutendem Ausmaß spezifisch. Z. B. wird γ -Oxyglutaminsäure nicht durch Einwirkung eines Homogenats von *Phlox*, wo sie gefunden wurde, decarboxyliert, obgleich dieses Homogenat die Glutaminsäure decarboxyliert. γ -Oxyglutaminsäure konnte bisher mit *E. Coli* decarboxyliert werden.

Piperidin- und Pyrrolidin-Derivate

Diese Gruppe von Aminosäuren ist in den letzten Jahren um eine Anzahl neuer Säuren bereichert worden. Zumindest die folgenden Säuren sind bekannt:



Pipocoläsäure entsteht nach Schweif und Mitarbeitern⁵⁸⁾ aus Lysin folgendermaßen:



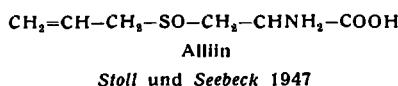
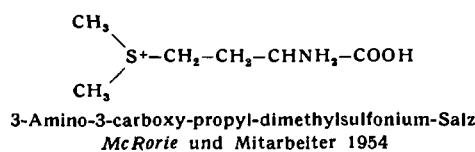
- ⁵⁰) *R. J. Morrison*, Biochem. J. 50, Proc. XIV [1952].
⁵¹) *R. M. Zecharius, J. F. Thompson u. F. C. Steward*, J. Amer. chem. Soc. 74, 2949 [1952]; 76, 1961 [1954].
⁵²) *F. E. King, T. J. King u. A. J. Warwick*, J. Amer. chem. Soc. 72, 3580 [1950].
⁵³) *K. Freudenberg*, Ber. dtsch. chem. Ges. 51, 976 [1918].
⁵⁴) *A. Wohl u. A. Johnson*, ebenda 40, 4712 [1907].
⁵⁵) *A. C. Hulme u. W. Arthington*, Nature [London] 173, 588 [1954]; *A. C. Hulme*, ebenda 174, 1055 [1954].
⁵⁶) *G. E. Urbach*, ebenda 175, 170 [1955].
⁵⁷) *A. C. Hulme u. F. C. Steward*, ebenda 175, 171 [1955].
⁵⁸) *R. S. Schweet, J. T. Holden u. P. H. Lowy*, J. biol. Chemistry 211, 517 [1954].

4- und 5-Oxypipecolsäure entstehen wahrscheinlich entsprechend aus γ - bzw. δ -Oxylysin^{30, 31}).

Andere Befunde bezüglich der freien Aminosäuren und deren Derivate

Bei den Untersuchungen von *Virtanen* und *Kari* über die freien Aminosäuren des Blütenstaubs, speziell dem leichten Blütenstaub von Windblütlern, wurden im Blütenstaub im allgemeinen viel mehr Piperidin- und Pyrrolidin-carbonsäuren angetroffen als in anderen Teilen der entsprechenden Pflanzen. Die Menge des freien Proline ist im allgemeinen sehr hoch und Oxyprolin und Pipecolsäure, die in den Blättern der untersuchten Pflanzen (*Alnus*, *Betula*, *Corylus*, *Salix*, *Secale*, *Quercus*) garnicht vorgefunden wurden, waren zumeist im Blütenstaub anzutreffen. Es hat den Anschein, als ob sich bei der Bildung des Blütenstaubs, bei dem sich zugleich ein Trocknungsprozeß vollzieht (Trockensubstanzgehalt des Blütenstaubs $\sim 90\%$), aus Glutaminsäure Prolin und aus Lysin Pipecolsäure bilde. Die umgekehrte Reaktion wird möglich, wenn das Blütenstaubteilchen nach dem Auftreffen auf die Narbe des Blütenstempels Wasser aufnimmt.

Außer den bisher erwähnten Aminosäuren sind auch in anderen Aminosäure-Gruppen neue Entdeckungen gemacht worden. Von den neuen Schwefel-haltigen Aminosäuren ist das aus Kohl isolierte Methyl-sulfonium-Derivat des Methionins zu erwähnen (*McRorie* und Mitarbeiter³²), sowie das von *Stoll* und *Seebeck*³³ aus Knoblauch bereits 1947 isolierte und charakterisierte Alliin, das durch Einwirkung der Alliinase desaminiert wird, wobei u. a. Brenztraubensäure und Ammoniak entstehen. *Synge* und Mitarbeiter^{34a} haben aus Kohl die dem Alliin entsprechende Methyl-Verbindung isoliert.



Das Alliin ist auch in der neuesten Aminosäure-Literatur unbachtet geblieben, was in unserem Laboratorium unliebsam bemerk wurde, als wir vor einigen Jahren zu ergründen versuchten, wie sich in Zwiebeln beim Zerkleinern plötzlich beträchtliche Mengen Brenztraubensäure bilden. In Zwiebeln wurde eine Schwefel-haltige Aminosäure chromatographisch festgestellt, bei deren enzymatischer Oxydation äquivalente Mengen Brenztraubensäure und Ammoniak entstanden (*Vilkki*³¹). Erst dann fanden wir in der Literatur, daß *Stoll* und *Seebeck* mehrere Jahre zuvor aus Knoblauch Alliin isoliert und die Bildung der Brenztraubensäure aufgeklärt hatten.

In verschiedenartigen Antibioticis, die aus Bakterien und Actinomyceten isoliert worden sind, hat man als strukturelle Bestandteile Diaminopropionsäure, Diaminobuttersäure und Diaminocapronsäure sowie einige Schwefel-haltige Aminosäuren gefunden.

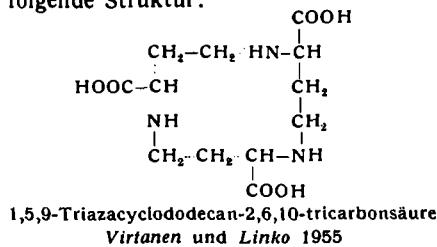
³⁰) R. A. *McRorie*, G. L. *Sutherland*, M. S. *Lewis*, A. D. *Barton*, M. R. *Glazener* u. W. *Shive*, J. Amer. chem. Soc. 76, 115 [1954].

³¹) A. *Stoll* u. E. *Seebeck*, Experientia 3, 114 [1947], Helv. chim. Acta 31, 189 [1948]; *Scientia pharmac.* 18, 61 [1950].

^{32a}) R. L. M. *Synge*, briefliche Mitteilung 1955.

³³) P. *Vilkki*, Suomen Kemistilehti B 27, 21 [1954].

Ein eigentümliches cyclisches Homoserin-Derivat haben *Linko* und *Virtanen*³²) in einigen Pflanzen der Familie *Liliaceae*, insbesondere in *Polygonatum*-Arten und *Convallaria* gefunden. Die bisherigen Tatsachen, welche in Übereinstimmung mit dem Infrarotspektrum stehen, sprechen für folgende Struktur:



Man kann die Verbindung somit als ein Homoserin-Derivat betrachten, das durch eigenartige Wasserabspaltung aus drei Homoserin-Molekülen entstanden ist. Offenbar muß irgendein spezifisches Enzym hinter dieser Reaktion stehen. Es ist interessant zu beobachten, daß in den Pflanzen, in welchen dieses cyclische Homoserin-Derivat vorkommt, kein freies Homoserin feststellbar ist. Es ist daher möglich, daß die Verbindung nicht direkt aus Homoserin, sondern vielleicht aus dessen Vorstufe entstanden ist.

In den Chlorophyll-haltigen Pflanzen bildet sich der Hauptteil der neuen organischen Materie der Erdkugel. Wenn wir von Seepflanzen absehen, so sind es die mehrzelligen Pflanzen, die die Erdkugel bedecken und den Hauptanteil der organischen Materie aufbauen. Die Kenntnis der Chemie und des Stoffwechsels der Pflanzen ist jedoch noch in bedauerlichem Maße mangelhaft. Die rasche Entdeckung zahlreicher neuer Keto- und Aminosäuren in Pflanzen in den letzten beiden Jahren beweist anschaulich, welch unbekannte Welt die Pflanzen uns im chemischen Sinn noch darstellen. Unsere Kenntnisse über die Entstehung, Aufgaben und Bedeutung der neuen Aminosäuren sind noch gering. Das verhältnismäßig allgemeine Vorkommen von Homoserin als freie Aminosäure in den verschiedenartigsten Pflanzen (Homoserin wurde auch in Proteinen von Preißelbeeren (Beeren und Blätter) gefunden³³) ist recht interessant, da diese Aminosäure als Zwischenprodukt eine zentrale Stellung im Methionin-Stoffwechsel einnimmt und aus ihr auch Threonin gebildet werden kann. Andererseits ist die Synthese des Homoserins aus Asparaginsäure³⁴) über Asparagylphosphat nachgewiesen. Die Anwesenheit der γ -Oxyglutaminsäure und α -Aminoadipinsäure in Proteinen verleiht diesen schon an sich eine eigene Bedeutung. Die Piperidin-2-carbonsäuren sind, wie bereits erwähnt, eng mit dem Lysin-Stoffwechsel verbunden und möglicherweise auch mit der Synthese gewisser Alkalioide, z. B. vom Coniin-Typ. Vermutungen über die Entstehungsweise der anderen neuen Amino- und Ketosäuren und deren Zusammenhänge mit dem Stickstoff-Stoffwechsel sind möglich, doch zuverlässige Fakten unbedingt wichtiger. Schon jetzt kann man voraussehen, daß die neuen Amino- und Ketosäure-Funde außer dem Stickstoffwechsel auch hinsichtlich der Systematik, der Taxonomie und der Entwicklungsgeschichte der Pflanzen von Bedeutung sein können. Der großen Formenmannigfaltigkeit des Pflanzenreichs entspricht auch eine ähnliche Vielfalt der chemischen Zusammensetzung.

Eingeg. am 31. Mai 1955 [A 657]

³²) A. I. *Virtanen* u. P. *Linko*, Acta chem. Scand. 9, 551 [1955].

³³) M.-L. *Vähäalo* u. A. I. *Virtanen*, nicht publiziert.

³⁴) S. *Black* u. N. G. *Wright*, J. Amer. chem. Soc. 75, 5766 [1953].