

D-Tryptophan in höheren Pflanzen

Bei der Untersuchung natürlich vorkommender Indolverbindungen in höheren Pflanzen fällt eine Ehrlich-positive Verbindung auf, die oft in recht erheblichen Mengen auftritt. Es handelt sich um eine saure, ätherlösliche, ninhydrin-negative Substanz, die nach alkalischer Hydrolyse Tryptophan liefert. Dass es sich dabei um ein acyliertes Tryptophan handelt, wird dadurch wahrscheinlich, dass Malonsäure gleichzeitig im Hydrolysat nachzuweisen ist. Offenbar liegt das von GOOD UND ANDREAE¹ nach Fütterung von Spinatblättern mit DL-Tryptophan gefundene Malonyl-Tryptophan vor. Zur endgültigen Charakterisierung dieser Verbindung war es wichtig, die optische Konfiguration der Tryptophankomponente zu erkennen. Malonyl-Tryptophan wurde aus Samen der Leguminose *Caragana arborescens* oder aus reifen Apfelfrüchten² isoliert. Das zerkleinerte Gewebe wurde mit Äther überschichtet, nach 12 Std abgegossen und zweimal nachextrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden eingedampft und auf Whatman No. 3 Papier aufsteigend in Isopropanol - NH₃ - Wasser (6:1:3) chromatographiert. Die Bande mit dem *R_F* 0.52 wurde abeluiert und in *n*-Butanol - Eisessig - Wasser (5:1:2,2) *R_F* 0.78-rechromatographiert. Anschliessend wurde entweder das hochgereinigte Malonyl-Tryptophan direkt mit 2 N H₂SO₄ 80 min bei 100° hydrolysiert³ oder aber nach Decarboxylierung⁴ bei 150° das so entstandene und nochmals chromatographierte Acetyl-Tryptophan derselben Hydrolyse unterworfen.

Das freigesetzte Tryptophan wurde durch Chromatographie des auf dem Papier über gasförmigem NH₃ neutralisierten Hydrolysates isoliert. In dieser Weise wurden aus 2.25 kg Äpfeln 0.9 μ Mol reines Tryptophan gewonnen. Die Amino-äure wurde mit D-Aminosäure-Oxydase (EC 1.4.3.3)⁴ unter Weglassung der Katalase (EC 1.11.1.6) 75 min oxydiert; dann wurden 20 μ Mol H₂O₂ zugesetzt. Auf diese Weise wurde das entstandene Indolpyruvat quantitativ in Indolessigsäure umgewandelt. Nach 30 min wurde angesäuert, vom Protein getrennt und die entstandene Säure mit Äther extrahiert. In dem Ätherextrakt liess sich nach Chromatographie (Isopropanol - NH₃ - wasser (8:1:1)) durch positive Ehrlichreaktion und durch Biertest mit dem Avena-Streckungswachstumstest⁵ einwandfrei Heteroauxin in der mit Indolessigsäure identisch laufenden Zone (*R_F* 0.39) nachweisen. L-Aminosäure-Oxydase blieb ohne Wirkung auf die Aminosäure. Ein weiterer Beweis, dass es sich bei der im Malonyl-Tryptophan vorliegenden Aminosäure um D-Tryptophan handelt, wurde dadurch erbracht, dass nach Inkubation von 148 Angiospermenarten mit D-Tryptophan 134 Pflanzen zum Teil in grosser Menge Malonyl-Tryptophan bildeten, während bei den mit L-Tryptophan gefütterten Pflanzen keinerlei Konjugierung eintrat. Die Biosynthese von D-Tryptophan durch eine Tryptophan-Racemase wird dadurch unwahrscheinlich. Weiterhin wurde ein Stengel von *Myrrhis odorata* drei Wochen lang mit $2 \cdot 10^{-3}$ M DL-Tryptophan (pH 6.8) gefüttert, das Malonyl-Tryptophan isoliert und daraus das Tryptophan auf die oben beschriebene Weise dargestellt. Es zeigte sich, dass bei der Oxydation von 2 μ Mol des so gewonnenen Tryptophan mit D-Aminosäure-Oxydase ein Sauerstoffverbrauch von 90 % des theoretisch geforderten, auf die eingesetzte Menge an Tryptophan bezogenen, Wertes erreicht wurde. Indolessigsäure liess sich abermals durch Farbreaktion und Biertest eindeutig nachweisen.

Es ist somit klar erwiesen, dass D-Tryptophan natürlich vorkommt und es sich bei dem pflanzlichen Konjugat um α -N-Malonyl-D-Tryptophan handelt. Die Ver-

bindung wurde chemisch durch Zusammenreiben von Malonylhalbchlorid mit D-Tryptophan unter Feuchtigkeitsausschluss in Anlehnung an die Darstellung von S-Malonyl-N-Caprylcysteamin⁶ hergestellt, und verhielt sich in jeder Weise mit dem natürlichen Produkt identisch. Das im Konjugat vorliegende D-Tryptophan zeigt weite Verbreitung im Pflanzenreich und konnte natürlich vorkommend in Früchten oder vegetativem Gewebe folgender Arten chromatographisch nachgewiesen werden: *Astragalus baeticus*, *Caragana arborescens*, *Cotoneaster adpressa*, *Dryopteris filix-mas*, *Lathyrus platyphyllos*, *Malus silvestris*, *Myrrhis odorata*, *Papaver somniferum*, *Phaseolus coccineus*, *Pirus communis*, *Portulaca oleracea*, *Solanum tuberosum*, *Sorbus thianshanica*, *Vicia faba*.

Die natürliche Konzentration an Malonyl-Tryptophan im Apfel (Golden Delicious) beträgt zirka 0.8 μ Mol/kg Frischgewicht und hängt vom Reifegrad der Frucht ab.

Unseres Wissens handelt es sich hiermit um das erste natürliche Vorkommen einer D-Aminosäure in höheren Pflanzen und um das erste natürliche Vorkommen von D-Tryptophan in der Natur.

Botanische Institut der Universität, München 19 (Deutschland)

M. H. ZENK
H. SCHERF

¹ N. E. GOOD UND W. A. ANDREAE, *Plant Physiol.*, 32 (1957) 561.

² G. V. RAUSSENDORFF-BARGEN, *Planta*, 58 (1962) 471.

³ J. P. GREENSTEIN, IN S. P. COLOWICK AND N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. 3, Academic Press, New York, 1957, p. 561.

⁴ P. BOULANGER UND R. OSTEUX, *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim, 1962, p. 367.

⁵ S. P. SEN, *Papierchromatographie in der Botanik*, Springer Verlag, Berlin, 1959, p. 248.

⁶ H. EGERER UND F. LYNEN, *Biochem. Z.*, 335 (1962) 540.

Eingegangen den 3. Dezember, 1962

Biochim. Biophys. Acta, 71 (1963) 737-738

SC 2219

Phenolic compounds in the cockroach ootheca

The hardening and darkening of the cockroach ootheca is probably the best understood example of sclerotization, the process in which proteins are stabilized by the tanning action of quinones. In the ootheca the *o*-quinone is derived from protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid)¹⁻³, although there is no definite chemical proof for the final step (cross-linking of the protein) in the reaction. DENNELL⁴, KENNAUGH⁵ and MALEK⁶ have recently reported the identification of "aminophenols" in alkaline hydrolysates of hard insect cuticles and they have used this as evidence to support theories of *p*- or *o*-quinone tanning. The chemical basis for the identification of these "aminophenols" cannot be considered satisfactory. The cockroach ootheca should be an ideal material for such a study and this communication records attempts to detect and identify phenols in hydrolysates of oothecae.

Powdered, fully hardened oothecae from *Periplaneta americana* (for preparation see HACKMAN AND GOLDBERG⁷) were hydrolysed with alkaline stannite⁸, the hydroly-

Biochim. Biophys. Acta, 71 (1963) 738-740