

Über das Vorkommen von Canavanin in heimischen Pflanzen*

Von

J. Mannhalter¹ und **H. Michl**

Aus dem Chemischen Institut der Hochschule für Bodenkultur, Wien,
Österreich

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 18. März 1974)

Occurrence of Canavanine in Austrian Cultivars

Seeds of 20 species and cultivars of legumes, growing in Austria, were examined for the arginin antagonist canavanine. Species of practical importance for food and feed were essentially low (less than 0.04%) or void of this amino acid. Only excessive feeding of *Medicago sativa* (0.6% canavanine in seeds) or *Vicia villosa* (1–2%) may deteriorate the metabolism. The data are in accordance with the chemical taxonomy of *Turner, Harborne* and *Bell* for legumes. On the other hand, the occurrence of small amounts of canavanine in *Allium cepa* (onion), a Liliaceae, proves that the genetic factors for the biosynthesis of canavanine are not confined to Papilionoideae but have a wider distribution.

Die Aminosäure Canavanin unterscheidet sich von Arginin nur durch den Ersatz der Methylengruppe (C-Atom 5) durch eine Sauerstoffbrücke. Auf Grund dieser strukturellen Ähnlichkeit kann Canavanin zahlreiche Stoffwechselforgänge des Arginins beeinflussen und als Antimetabolit dieser Aminosäure aufgefaßt werden^{2, 3, 4}.

Canavanin gilt als typisches Syntheseprodukt der Schmetterlingsblütler (Papilionoideae bzw. Faboideae, Lotoideae), einer Unterfamilie der Leguminosen. Nach einer Aufstellung von *Turner* und *Harborne*⁵ bzw. *Bell*⁶ wurden in rund 60% der 540 (von 12 000) untersuchten Arten Canavanin gefunden. Der Nachweis erfolgte meist ohne Voranreicherung mittels der Farbreaktion mit Ammonium-dinatriumpentacyanoamminferat(II) (Ammonium-dinatriumphosphat, „*Fearons* Reagens“)⁷. Im folgenden sollten Samen in Österreich vorkommender Leguminosenarten und -sorten, vor allem solche von wirtschaftlicher

* Herrn Prof. Dr. O. Hoffmann-Ostenhof zum 60. Geburtstag gewidmet.

Bedeutung, qualitativ, bzw. *Medicago sativa* (Luzerne) und *Vicia villosa* (Zottelwicke, Winterwicke) quantitativ in ruhendem und angekeimtem Zustand untersucht werden. Ebenso wurde früheren Hinweisen auf das Vorkommen von Canavanin in Liliengewächsen⁸ nachgegangen. Zur Erhöhung der Sicherheit des Nachweises mußten elektrophoretische und chromatographische Verfahren für Canavanin und eventuelle Abbauprodukte adaptiert und durch mikrobiologische Methoden ergänzt werden.

Material und Methoden

L-Canavaninsulfat: Sigma C 88 941, Lot CA 078. Dieses Präparat verhielt sich bei allen chromatographischen und elektrophoretischen Tests einheitlich.

L-Canalindipikrat: Sigma C 0510, Lot 92 C-1910. Zersetzungspunkt 190—194 °C. Nach Freisetzen des Canalins mit H_2SO_4 — $Ba(OH)_2$ ⁹ traten zwei nahezu gleich starke Flecken bei der Papierchromatographie (Papier Whatman 3 MM) auf. Ihre R_F -Werte in *n*-Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 5 (*v/v/v*) waren 0,35 und 0,43, wobei der langsamer wandernde Fleck dem Canalin entsprach.

Ammonium-dinatrium-pentacyanoamminiferrat(II): Fluka 09710.

Pepton: Oxoid Nr. L 37, Batch 1367790; das Produkt enthielt nach Firmenangaben 5,43% Arginin.

Na-Penicillin G: Biochemie G. m. b. H., Kundl, Österreich.

Alle anderen Chemikalien waren Produkte der Fa. Merck.

Samen: Diese wurden z. T. im Hochschulgarten gesammelt, z. T. handelte es sich um handelsübliche Produkte der Samenfachgeschäfte T. Wenisch und Gebr. Boschan, Wien. Für wertvolle Ratschläge danken wir Prof. Dipl.-Ing. Dr. J. Weindlmayr (Vorstand des Institutes für landwirtsch. Pflanzenschutz und forstliche Phytopathologie) und Dipl.-Ing. Dr. W. Ruckebauer (Inst. f. Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung).

Zwiebel: Für Zwiebel (*Allium cepa*, Sorte Globe F₁ Harris) danken wir der Höheren Bundeslehr- und Versuchsanstalt für Gartenbau, für Knoblauch (*Allium sativum*, Stamm 4, 1972) dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung.

Anzucht der Samen: Diese erfolgte nach Standardmethoden¹⁰ bis zu einer Keimdauer von 10 Tagen; die Probenentnahme erfolgte alle 48 Stdn.

Aufbereitung: Nach Zerkleinern im Mixer bei 0°, Gefriertrocknen und Entfetten durch Ätherextraktion im Soxhlet wurden die Aminosäuren und Begleitstoffe mit 50proz. Alkohol herausgelöst. Dabei wurden 5 g des lyophilisierten und entfetteten Materials je 3mal mit 50 ml des Alkoholgemisches behandelt. Die vereinigten Extrakte wurden im Rotationsverdampfer bei 40° auf wenige ml eingengt. Nach Ansäuern auf pH 2 und Zentrifugieren adsorbierte man die Aminosäuren an eine Dowex 50 W × 8-Säule (1,2 × 20 cm) und eluierte mit 2*n*-NH₃ bis zur ninhydrinnegativen Tüpfelreaktion. Nach neuerlichem Einengen wurde die Lösung zur Analyse verwendet.

Nachweis und Bestimmung des Canavanins: Die Abtrennung von den anderen Aminosäuren erfolgte durch Hochvoltelektrophorese in Tris—HCl-Puffer von pH 8,2¹¹ bei 55 V/cm, 4 °C, 1 Stde. Der R_{Lys} -Wert (korr.) des Canavanins lag bei 0,10, der von Canalin bei 0,00.

Fallweise wurde auch Papierchromatographie (Whatman 3 MM) mit *n*-Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 5 verwendet: R_F des Canavanins 0,07; des Canalins 0,35. Die Anfärbung erfolgte unter anderem mit „*Fearons* Reagens“⁷ [1proz. (*w/v*) Lösung von Ammonium-dinatrium-pentacyanoamminferat(II) in Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 7,0] oder Ninhydrin (0,2% in Aceton). Nach dieser Aufbereitung lag die Nachweisgrenze bei 3—4 µg Canavanin. Die quantitativen Bestimmungen erfolgten entweder nach *Archibald*¹² oder im Aminosäureanalysator.

Bestimmung im Aminosäureanalysator: Verwendet wurde ein Beckman Unichrom Gerät. Zur Abtrennung des Canavanins von den anderen basischen Aminosäuren wurde die Füllhöhe der kurzen Säule auf 22—24 cm verlängert. Als Austauscher wurde ein Beckman Custom Research Resin PA-35 verwendet; die Säulentemp. lag bei 55°, der Druck bei 6 atü. Aus Testgemischen wurden die Elutionszeiten (Elutionsmittel: 0,35*n*-Na-Citratpuffer, pH 5,28) und die „Flächenfaktoren“ (d. h. eine der Fläche des „peak“ von 1 µMol Aminosäure entsprechende Zahl) ermittelt (Tab. 1).

Tabelle 1

Aminosäure	Elutionszeit, Min.	Flächenfaktor
Lysin	77	28,11
Histidin	85	21,66
Ammoniak	97	
Canavanin	117	25,70
Arginin	163	15,56

Canalin kann zusammen mit den neutralen Aminosäuren (vgl. auch elektrophoretisches Verhalten) auf der langen Säule bestimmt werden. Es wandert dabei etwas langsamer als Alanin.

Ergebnisse der Bestimmungen von *Vicia villosa* und *Medicago sativa* siehe Abb. 1 und Abb. 2.

Agardiffusionstest: Hemmhöfe werden in üblicher Weise¹³ auf den mit Mikroorganismen beimpften Platten durch die von Filterpapierplättchen aufgesaugten Lösungen bewirkt. Als Testorganismen wurden auf Schrägagar (*Eugonagar vera* 45,4 g/l) 48 Stdn. bebrütete Stämme von *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Sarcina lutea* und *Saccharomyces cerevisiae* verwendet.

Für die Platten wurde folgender Nähragar unter sorgfältiger Kontrolle des Arginingehaltes benützt:

Pepton	15,6 g
NaCl	5,6 g
D-Glucose	1,0 g
Agar-Agar	12,0 g
Mit aq. dest. ad	1000 ml

10 ml der fertigen Nährlösung enthielten 8,48 mg Arginin, von denen 8,47 mg vom Pepton und etwa 0,01 mg vom Agar kamen. Innerhalb von 24 Stdn. wurde *Saccharomyces cerevisiae* nicht, *Escherichia coli* nur gering-

fällig von 13 mg Canavanin pro ml gehemmt. Bei *Sarcina lutea* und *Bacillus subtilis* entsprach die Hemmung von 13 mg Canavanin pro ml etwa der von 5 Einheiten Na-Penicillin G.

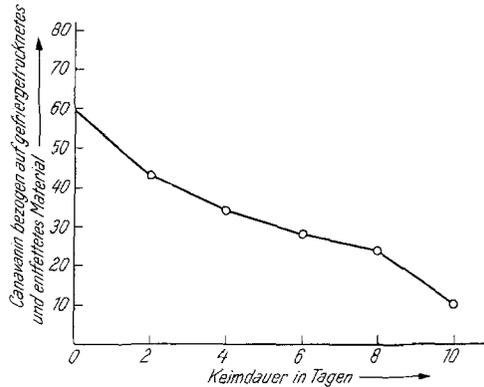


Abb. 1. *Medicago sativa*, Veränderungen des Canavaningehaltes während der Keimung (in 10⁻²%)

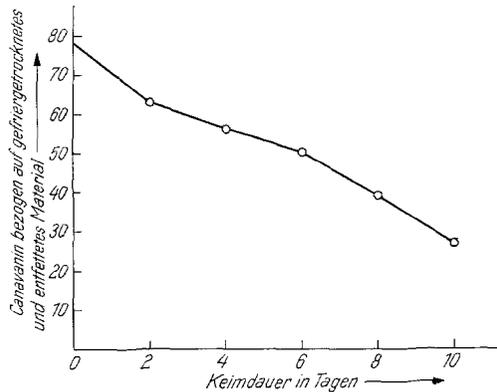


Abb. 2. *Vicia villosa*, Veränderung des Canavaningehaltes während der Keimung (in 10⁻²%)

Ergebnisse und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 20 in Österreich beheimatete bzw. gebaute Leguminosen auf ihren Canavaningehalt untersucht. Im Gegensatz zu anderen Autoren erschien uns eine entsprechende Vorbehandlung der Pflanzenextrakte und eine Isolierung des Canavanins für einen einwandfreien Nachweis unerlässlich. Die Ergebnisse zeigt Tab. 2.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann festgestellt werden, daß die Gefahr einer Canavaninvergiftung bei den als Nahrungsmittel ver-

Tabelle 2

Familie LEGUMINOSAE	
Unterfamilie CAESALPTINOIDEAE	
Tribus CAESALPINIEAE	
GLEDTISIA triacanthos	---
Tribus BAUHINIEAE	
CERCIS siliquastrum	---
Unterfamilie PAPILIONOIDEAE	
Tribus GENISTEAE	
LABURNUM anagyroides	--
LABURNUM alpinum	--
Tribus ASTRAGALEAE	
ROBINIA pseudocacia	+
Tribus TRIFOLIEAE	
MEDICAGO sativa, Luzerne	+
Tribus FABEAE	
VICIA sativa, Sommerwicke	---
VICIA villosa, Winterwicke	+
VICIA faba, Pferdebohne	--
PISUM averne, Futtererbse	--
PISUM sativum, var. vulgare, Auslöseerbsen	
Sorte Allerfrüheste Mai	---
PISUM sativum, var. medullare, Markerbsen	
Sorte Wunder von Amerika	--
PISUM sativum, var. saccharatum, Zuckererbse	
Sorte Frühe Heinrich	--
LATHYRUS odoratus, Edelwicken ² ,	
Sorte Burpee's Orange	
Tribus PHASEOLEAE	
GLYCINE max., Sojabohne	---
PHASEOLUS vulgaris, var. nanus, Buschbohnen	
Sorte Amethyst	---
PHASEOLUS vulgaris, var. nanus, Buschbohnen	
Sorte Wachs Beste von allen	---
PHASEOLUS vulgaris, var. vulgaris, Stangenbohnen	
Sorte Haubner's Islebia	---
PHASEOLUS vulgaris, var. vulgaris, Stangenbohnen	
Sorte Wachs Berner Butter	---
PHASEOLUS coccineus, Feuerbohnen	
Sorte Weiße Riesen = Emergo	---

wendeten Leguminosen nicht und bei den als Futtermittel gebräuchlichen nur bei einseitiger Verfütterung von Luzerne (*Medicago sativa*) oder einer bestimmten Wickenart (*Vicia villosa*) gegeben ist.

Der Canavaningehalt dieser Schmetterlingsblütler nahm nach dem Ankeimen ständig ab. So ging beispielsweise der Canavaningehalt von *Medicago sativa* innerhalb von 10 Tagen von 0,6% auf 0,1% zu-

rück. Samen, die Canavanin in dieser Größenordnung enthalten, benützen es offenbar als Stickstoffspeicher, wobei es einerseits wegen des höheren Stickstoffgehaltes (50% mehr N pro Mol als Asparagin), andererseits wegen seiner toxischen Wirkung gegen Mikroorganismen und Tiere dem sonst als Stickstoffspeicher verwendeten Asparagin überlegen ist. Derartige Mengen an Canavanin wurden bisher nur bei Schmetterlingsblütlern (Papilionoideae), einer Unterfamilie der Leguminosen, gefunden.

Daß die Fähigkeit zur Canavaninbildung aber weiter verbreitet ist, als man bisher annahm, zeigt die Tatsache, daß auch in einem Liliengewächs, nämlich in der gewöhnlichen Zwiebel (*Allium cepa*), $2\text{--}2,5 \cdot 10^{-4}\%$ Canavanin nachgewiesen werden konnte. Die vorherrschende Annahme, die für die Biosynthese des Canavanins erforderlichen genetischen Faktoren hätten sich erst während der Evolution der Schmetterlingsblütler entwickelt, müßte also fallengelassen oder dahingehend modifiziert werden, daß sie bei der Evolution der höheren Pflanzen viel früher entstanden sind oder aber Parallelentwicklungen auftraten.

Literatur

- ¹ Teil der Diplomarbeit Dipl.-Ing. *J. Mannhalter*, Hochschule für Bodenkultur, Wien 1974.
- ² *B. Tschiersch*, *Flora* **147**, 405 (1959).
- ³ *A. Meister*, *Biochemistry of Amino Acids*, S. 252. New York: Academic Press. 1965.
- ⁴ *H. Michl*, *Lebensmittel und Ernährung* **25**, 197 (1972).
- ⁵ *B. L. Turner* und *J. B. Harborne*, *Phytochem.* **6**, 863 (1967).
- ⁶ *E. A. Bell*, in: *Chemotaxonomy of the Leguminosae* (*J. B. Harborne*, *D. Boulter* und *B. L. Turner*, Hrsg.), S. 179. London: Academic Press. 1971.
- ⁷ *W. R. Fearon*, *Analyst* **71**, 562 (1946).
- ⁸ *J. Kuon* und *R. A. Bernhard*, *Food Res.* **28**, 298 (1963).
- ⁹ *G. A. Rosenthal*, *Analyt. Biochem.* **51**, 354 (1973).
- ¹⁰ Vorschrift der Internationalen Vereinigung für Saatgutprüfung, veröffentlicht in *Proc. Int. Seed Test. Ass.* **31**, 577 (1966), Herausgeber: *A. F. Schoorel*.
- ¹¹ *H. M. Rauen*, *Biochemisches Taschenbuch*, S. 99. Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York: Springer. 1964.
- ¹² *R. M. Archibald*, *J. Biol. Chem.* **165**, 169 (1946).
- ¹³ *W. Oberzill*, in: *Antibiotica*, I/1, S. 207 (*R. Brunner* und *G. Machek*, Hrsg.). Nürnberg: Verlag H. Carl. 1962.

Prof. Dr. H. Michl
Chemisches Institut
Hochschule für Bodenkultur
Gregor-Mendel-Straße 33
A-1180 Wien
Österreich