

SHORT COMMUNICATION

ANALYTISCHE UNTERSUCHUNGEN DER AMINOSÄUREN UND DER CHLOROPHYLLBILDUNG IN KARTOFFELKEIMEN

TH. BREYHAN und F. HEILINGER

Chemisches Untersuchungslaboratorium und Institut für Pflanzenbau
und Saatguterzeugung der Forschungsanstalt für Landwirtschaft,
Braunschweig-Völkenrode, Germany

(Eingegangen 4 Januar 1966)

Zusammenfassung—Es wurde versucht, den Zusammenhang zwischen dem Prolin, anderen Aminosäuren und der Chlorophyllbildung in Kartoffelkeimen durch quantitative Analyse der beteiligten Komponenten zu erkennen. Zu diesem Zweck wurden vorgekeimte Knollen in geschlossenem System in Stickstoff, andere in Luft bei normaler Tageslichteinwirkung aufbewahrt und die Keime nach Beendigung der Versuche analysiert. Es zeigte sich, dass die in Stickstoff gehaltenen Keime trotz uneingeschränkter Lichteinwirkung gegenüber den in normaler Atmosphäre nicht ergrünten. Auch wurden im Gehalt an einigen Aminosäuren zum Teil erhebliche Unterschiede festgestellt. In einer anderen Versuchsreihe wurden Knollen mit Prolin, δ -Aminolevulin-, δ -Aminovaleriansäure bzw. mit Wasser (Kontrolle) behandelt und die Keime auf ihren Gehalt an Aminosäuren und Chlorophyll untersucht. Der Chlorophyllgehalt in den Keimen war dann am höchsten, wenn die zugehörigen Knollen mit Prolin oder mit δ -Aminolevulinsäure vorbehandelt waren.

Abstract—The relationship between proline, other amino acids and the formation of chlorophyll in sprouts of potato tubers was studied by quantitative determinations of the components concerned. The sprouts of potato tubers that were stored in sealed jars in nitrogen with normal daylight did not form chlorophyll in contrast to those kept in air. Marked differences in the content of asparagine, serine (+ amides), proline and δ -aminolevulinic acid were found.

The shoots of tubers that were treated with either proline or δ -aminolevulinic acid had a higher chlorophyll content than those treated with δ -aminovaleric acid and water. There were also differences in the amounts of some amino acids.

EINLEITUNG

FRÜHERE Arbeiten über die Inhaltsstoffe der Kartoffelknolle haben ergeben, dass u.a. auch ihr Gehalt an freien Aminosäuren vor der Keimung zunimmt.¹ Bei Fortsetzung der Arbeiten wurde gefunden, dass das Prolin die in den Keimen ablaufenden Umsetzungen wesentlich beeinflusst.^{2,3} Durch Applikation von Knollen mit radioaktiv markiertem Prolin (^{14}C) konnte die Annahme einer Beteiligung des Proline an der Chlorophyllbildung in den Keimen gestützt werden.⁴ In analogen Versuchen von französischen Autoren⁵ wurde unter Verwendung von radioaktiv markiertem Prolin dessen Zusammenhang mit der Chlorophyllbildung untersucht, wobei junge Topinamburpflanzen als Versuchsstoff dienten. Die Auf trennung der radioaktiv markierten Chlorophylle erfolgte an Säulen von Aluminiumoxyd. Es wurde auch beobachtet, dass der Prolinegehalt in den Blättern blattrollkranker Kartoffelpflanzen bei sich verminderndem Chlorophyllgehalt zunimmt.⁶

Um bei der Anwendung von radioaktiv markiertem Prolin quantitative Aussagen über

¹ W. IRION und O. FISCHNICH, *Z. Pflanzenähr., Düngung Bodenk.* **99**, 248 (1952).

² TH. BREYHAN, F. HEILINGER und O. FISCHNICH, *Landwirtsch. Forschung* **12**, 293 (1959).

³ F. HEILINGER, O. FISCHNICH und TH. BREYHAN, *Landbauforsch. Völkenrode* **11**, 63 (1961).

⁴ TH. BREYHAN, O. FISCHNICH und F. HEILINGER, *Landbauforsch. Völkenrode* **12**, 78 (1962).

⁵ H. DURANTON und M. MAILLE, *Compt. Rend.* **253**, 1003 (1961).

⁶ E. PERDRIEZ und G. MACQUAIRE, *Compt. Rend.* **257**, 3208 (1963).

dessen Beteiligung an der Chlorophyllbildung machen zu können, ist zu berücksichtigen, dass 1. neben dem applizierten, radioaktiv markierten Prolin auch das genuine Prolin an der Chlorophyllbildung beteiligt ist. 2. Der bei Versuchsanstellung präformierte Teil von Pigmentvorstufen (z.B. Porphobilinogen) berücksichtigt werden muss. 3. Das zu applizierende Prolin der Dynamik der Stoffwechselvorgänge bereits in der Knolle unterworfen ist und. 4. Bei den zum Chlorophyll führenden Reaktionen 20 Prozent der ursprünglichen Aktivität des Prolins durch Decarboxylierung in Form von $^{14}\text{CO}_2$ veratmet werden kann. Es sollte nun versucht werden, den Zusammenhang des Prolins und anderer Aminosäuren mit der Chlorophyllbildung durch analytische Untersuchungen zu erkennen. Die Versuchsanstellung hierbei war folgende:

- A. Vorgekeimte Kartoffelknollen wurden in geschlossenen Gefäßen in Stickstoff, andere in normaler Atmosphäre aufbewahrt und in völlig gleicher Weise dem Tageslicht ausgesetzt.
- B. Andere Knollen wurden mit Prolin, δ -Aminolävulinsäure, δ -Aminovaleriansäure und Wasser (als Kontrolle) behandelt und die Keime zum Ergrünen gebracht.

In der Versuchsanstellung A wurde trotz uneingeschränkter Lichtzufuhr eine Chlorophyllbildung in den in Stickstoff zur Entwicklung gebrachten Keimen nicht beobachtet, im Gegensatz zu den in normaler Atmosphäre entwickelten Keimen, die in der gleichen Entwicklungszeit ergrünten.

Die Aminosäuren der nach Versuchsanstellung A gewonnenen Keimextrakte zeigen zum Teil erhebliche, quantitative Unterschiede. Die Auswertung des Zahlenmaterials (Tabelle 1) ergab, dass vor allem bei Prolin, Asparaginsäure, Serin (+ Säureamide) und δ -Aminolävulinsäure besonders auffällige Unterschiede auftreten. Es kann angenommen werden, dass diese Unterschiede mit der bei dem Keimwachstum zur Verfügung stehenden Atmosphäre zusammenhängen. Es ist auch bekannt, dass eine Variierung der Zusammensetzung

TABELLE 1. ERGEBNIS DER QUANTITATIVEN ANALYSE
DER AMINOSÄUREN IN KEIMEN DIE UNTER NORMALEN
LICHTVERHÄLTNISSEN ZUM TEIL IN LUFT, ZUM TEIL IN
LUFT, ZUM TEIL IN STICKSTOFF GEWASCHEN SIND

Aminosäure	$\gamma/100 \text{ mg}$	
	In Luft	In Stickstoff
Asparaginsäure	61,6	14,0
Threonin	12,0	8,5
Serin (+ Amide)	165,4	35,0
Glutamin	19,6	3,3
Prolin	400,0	107,2
Glycin	3,0	2,0
Alanin	8,0	7,7
Valin	15,0	13,5
Isoleucin	5,0	9,3
Leucin	2,0	3,5
δ -Aminolävulinsäure	22,0	121,0
δ -Aminovaleriansäure	—	—
Lysin	+	+
Histidin	+	+
NH_3	15,1	14,3
Arginin	—	+

der Atmosphäre die Aktivität des multiplen Enzymsystems der Atmungskette verändert, insbesondere von Cytochrom *c* und einer zweiten Oxydase mit geringerer Sauerstoffaffinität.⁷

Die Auswertung der Versuchsanstellung B hat zu den folgenden Ergebnissen geführt. Durch die Behandlung der Knollen mit Prolin wird der Gesamtgehalt der freien Aminosäuren in den Keimen im Vergleich zur Kontrolle wesentlich erhöht (Tabelle 2) Daran sind vor allem Asparaginsäure, Serin (+ Amide), Prolin und δ -Aminolävulinsäure beteiligt.

TABELLE 2. ERGEBNIS DER QUANTITATIVEN ANALYSE DER AMINOSÄUREN IN KEIMEN, DEREN ZUGEHÖRIGE KNOllen MIT PROLIN, δ -AMINOLÄVULINSÄURE, δ -AMINOVALERIANSÄURE BZW. MIT WASSER (KONTROLLE) BEHANDELT WORDEN SIND

Aminosäure	Behandlung der Knollen mit			Wasser als Kontrolle
	Prolin (μ g/100 mg in den zugehörigen Keimen)	δ -Aminoläv.-Säure	δ -Aminoval.-Säure	
Asparaginsäure	76,0	54,0	46,2	57,8
Threonin	24,1	16,9	13,0	16,1
Serin (+ Amide)	251,4	166,2	151,1	180,5
Glutamin	17,2	12,4	+	+
Prolin	598,0	593,6	380,3	487,6
Glycin	11,3	4,0	+	+
Alanine	18,5	13,1	10,2	12,2
Valin	30,0	20,3	20,1	26,0
Isoleucin	10,6	7,4	5,0	7,2
Leucin	7,0	4,0	4,0	4,0
δ -Aminolävulinsäure	59,1	59,0	30,9	40,0
δ -Aminovaleriansäure	—	—	+	—
Lysin	+	+	21,2	20,5
Histidin	+	+	12,4	12,2
NH_3 und γ -AminoButtersäure	36,1	26,1	16,5	48,7
Arginin	+	+	14,3	16,3
Gesammte	1.139,3	977,0	725,2	929,1

Ahnliches gilt auch für die Behandlung der Knollen mit δ -Aminolävulinsäure. Auch hier findet sich die Erhöhung der Werte für die Aminosäuren in den Keimen, wobei Asparaginsäure und Serin, im Vergleich zur Kontrolle, niedriger liegen. Bei der Bestimmung des Chlorophylls hat es sich gezeigt, dass dann stets höhere Werte gefunden werden, wenn die zugehörigen Knollen mit Prolin oder δ -Aminolävulinsäure vorbehandelt worden waren (Tabelle 3). Es ist denkbar, dass das Porphobilinogen als Chlorophyllvorstufe unter der Einwirkung der δ -Aminolävulinsäuredehydrase aus zwei Molekülen der δ -Aminolävulinsäure unmittelbar bzw. aus dem Prolin über die δ -Aminolävulinsäure entsteht. In beiden Fällen findet der höhere Chlorophyllgehalt (im Vergleich zu den mit H_2O angesetzten Kontrollen) eine zwanglose Deutung.

Das Porphobilinogen ist in Kartoffelkeimen bisher nicht nachgewiesen worden. Unter Berücksichtigung der Arbeit von Cookson und Rimington über das Porphobilinogen und einer in dieser Arbeit beschriebenen Gewinnungsmethode aus pathologischem Harn⁸ wurden Versuche zur Isolierung des Porphobilinogens aus Kartoffelkeimen vorgenommen, worüber später nach Abschluss dieser Arbeit berichtet werden soll.

⁷ L. W. MAPSON und W. G. BURTON, *Biochem. J.* **82**, 19 (1962).

⁸ G. H. COOKSON und C. RIMINGTON, *Biochem. J.* **57**, 476 (1954).

TABELLE 3. CHLOROPHYLLGEHALT DER KEIME*

Behandlung der zugehörigen Knollen mit			Chlorophyll (mg/l.)	
	Log $\frac{I_0}{I}$ bei 663 m μ	Log $\frac{I_0}{I}$ bei 644 m μ	<i>a</i>	<i>b</i>
H ₂ O (Kontrolle)	0,115	0,058	1,097	0,698
δ -Aminovaleriansäure	0,109	0,055	1,039	0,662
δ -Aminolävulinsäure	0,125	0,065	1,290	0,793
Prolin	0,136	0,076	1,318	0,954

* 250,0 mg gefriergetrocknetes Material, extrahiert mit 80%igem Aceton; Endvolumen 50,0 ml; berechnet auf mg Chlorophyll pro Liter Extraktionsflüssigkeit.

METHODEN

Nach Beendigung der Versuche wurden jeweils 100 mg gefriergetrocknetes Keimmaterial 6 Stunden mit 50%igem Aethanol geschüttelt, in einen 100 ml Messkolben filtriert und mit 50%igem Aethanol quantitativ nachgewaschen. Von den auf Volumen gebrachten Lösungen wurden aliquote Teile auf dem Wasserbad zur Trockene gebracht, mit Pufferlösung pH = 2,2 aufgenommen und mittels Ionenaustauscher chromatographie im automatischen Verfahren (Beckman—Instruments) die Aminosäuren analysiert. Zur Bestimmung des Chlorophylls wurde das gefriergetrocknete Material der Keime (250 mg) mit wenig 80%igem Aceton in Gegenwart einer geringen Menge Na₂CO₃ in einer Reibschale verrieben, auf eine Porzellannutsche gebracht und in einen, in einem Wittschen Topf stehenden Messkolben von 50 ml abgesaugt. Die völlige Extraktion der Pigmente erfolgte mit 80%igem Aceton. Schliesslich wurde auf Volumen gebracht und in Unicam—Spektralphotometer bei 644 und 663 m μ gemessen. Das diskutierte Zahlenmaterial resultiert aus jeweils drei Parallelansätzen und stellt Mittelwerte dar.