

DIE ISOLERING, IDENTIFISERING EN BIOSINTESE  
VAN SEKERE VRYE AMINOSURE VAN ACACIA MELLIFERA  
SUBSP. DETINENS

deur

JACOBUS JOHANNES MARION MEYER

Voorgelê ter vervulling van n deel van die vereistes vir die graad

MAGISTER SCIENTIAE

in die Fakulteit Wis- en Natuurkunde,  
Departement Plantkunde,  
Universiteit van Pretoria,  
Pretoria

NOVEMBER 1984

Leier: Prof. dr. N. Grobbelaar



\*1286295\*

I N H O U D S O P G A W E

	BLADSY- NOMMER
1	<u>INLEIDING</u> 1
2	<u>ALGEMENE ISOLERINGS- EN ANALITIESE METODEDES</u> 3
2.1	Papierchromatografie 3
2.2	Dunlaagchromatografie 4
2.3	Ninhidrienkleurreaksie 6
2.4	Ioonuitruilingschromatografie 8
2.5	Ander isolerings- en analitiese metodes 10
2.5.1	Gaschromatografie 10
2.5.2	Elektroforese 11
2.5.3	Hoëdrukvløeistofchromatografie 12
2.5.4	Massaspektroskopie 12
2.5.5	Kernmagnetiese resonansiespektroskopie 13
2.5.6	Infrarooispektroskopie 16
2.5.7	Ultravioletspektroskopie 16
3	<u>DIE NIE-PROTEÏENAMINOSURE IN DIE GENUS ACACIA</u> 18
3.1	Die toksiese eienskappe van die aminosure 23
3.1.1	Die inhibering van die voeding van sekere insekte 23
3.1.2	Die inhibering van saadkieming en saailinggroei 24
3.2	Die biosintese van sekere nie-proteïenaminosure 25
3.2.1	Pipekoliensuur en sy derivate 26
3.2.2	2,3-Diaminopropionsuur en sy derivate 28
4	<u>MATERIAAL EN METODEDES</u> 30
4.1	Materiaal 30
4.2	Metodes 30
4.2.1	Ekstrahering van die aminosure uit die blare, sade en blomme 30
4.2.2	Stabiliteitstoetse 32
4.2.3	Papier- en dunlaagchromatografie 33
4.2.4	Skeiding van die aminosure deur middel van ioonuitruilingsharse 35
4.2.4.1	Vorbereiding van die ionuitruilingsharse 35

(ii)

	BLADSY- NOMMER	
4.2.4.2	Vorbereiding en aanbring van die aminosuur- oplossing op die ioonuitruilingskolomme	36
4.2.4.3	Versameling en analise van die eluaatfraksies	37
4.2.4.4	Verwydering van die buffer uit die aminosuuroplossing	37
4.2.5	Verdere suiwering van die aminosure met behulp van 'n Sephadexkolom en ultravioletmonitor	38
4.2.6	Identifisering van sekere aminosure	39
4.2.7	Toediening van radio-aktiewe aminosure aan die blare van <u>Acacia mellifera</u> subsp. <u>detinens</u>	40
4.2.8	Identifisering en bepaling van die aktiwiteit van die radio-aktiewe aminosure met behulp van radio-outogramme en 'n vloeistofflitsteller	41
4.2.9	Isolering van radio-aktiewe pipekoliensuur	42
5	<u>RESULTATE</u>	43
5.1	Stabiliteitstoetse	43
5.2	Papier- en dunlaagchromatografie	43
5.3	Isolering van die aminosure met behulp van 'n ioonuitruilingshars	48
5.4	Verdere isolering van die aminosure met behulp van 'n Sephadexkolom en ultravioletmonitor	50
5.5	Identifisering van sekere van die aminosure	50
5.6	Biosintese van sekere van die aminosure	63
6	<u>BESPREKING</u>	67
6.1	Die nie-proteienaminosure in die genus <u>Acacia</u>	67
6.2	Papier- en dunlaagchromatografie	69
6.3	Skeiding van die aminosure met Dowex 50 en Sephadex	71
6.4	Identifisering van sekere aminosure	71
6.5	Die biosintese van sekere van die aminosure	74
7	<u>SAMEVATTING</u>	90
8	<u>SUMMARY</u>	92
9	<u>DANKBETUIGINGS</u>	94
10	<u>LEWENSSKETS</u>	95
11	<u>LITERATUURLYS</u>	96

1 INLEIDING

Stikstof is die element met die hoogste konsentrasie in die aarde se atmosfeer. Tog kan slegs 'n paar plantspesies dié relatiewe inerte element benut. Dié plantspesies kan deur simbiose met sekere bakterie-soorte stikstofgas bind met die aanvanklike vorming van ammoniak. Ammoniak as sodanig is giftig vir die plant in hoë konsentrasies en word deur die plant vir die vorming van biologies funksionele molekule gebruik. Ammoniak word hoofsaaklik vir die biosintese van aminosure gebruik.

Afgesien van die proteïenaminosure is al meer as 400 ander aminosure uit natuurlike produkte geïdentifiseer. Ongeveer 240 verskillende nie-proteïenaminosure is in plante (Evans & Bell 1980), 50 ander in prokariotiese organismes en nog 75 ander in fungusse geïdentifiseer. Ongeveer 50 verskillende nie-proteïenaminosure kom in diere voor (Rosenthal 1982).

Baie van hierdie nie-proteïenaminosure is aromatische verbindings waarvan party heterosiklies is. 'n Kwart van die nie-proteïenaminosure is gehidroksileer. Daar is groot variasie in die heterosikliese aminosure wat behalwe koolstof, ook stikstof, suurstof en/of swavel binne die ring kan bevat (Rosenthal 1982).

Dit is bekend dat die spesies van die genus Acacia heelwat "ongewone" vrye nie-proteïenaminosure besit (Seneviratne & Fowden 1968b; Krauss

& Reinbothe 1972; Evans et al. 1977; Evans et al. 1979). So kom verskeie "ongewone" nie-proteïenaminosure ook in Acacia mellifera (Vahl) Benth. subsp. detinens (swarthaak) voor. Die naam van die spesie beteken: die heuningdraende Acacia wat mens maklik vasvang. A. mellifera is normaalweg 'n boom wat 4 tot 5 meter hoog word maar kan soms tot 7 meter hoog word. Die spesie groei dikwels as 'n veelstammige struik wat 1,5 tot 2,5 meter hoog word (Carr 1976). Swarthaak verloor normaalweg sy blare na die eerste ryp. Dit blom van September tot Oktober. Die blomme het 'n roomwit kleur. Die plantsoort is een van die min Acacia spesies wat beide 'n bolvormige bloeiwyse en gekromde stipuuldorings het. Die dorings het 'n kenmerkende swart kleur, is na agter gekrom en kom in pare voor. Die peule is papieragtig, plat en ovaalvormig met 2 tot 3 sade per peul. Die saamgestelde blare besit elk normaalweg 3 paar pinnas (Palmer & Pitman 1972) en 3 tot 4 paar pinnule (Robbertse 1971).

Die spesie kom in Noord-Transvaal, Westelike Oranje-Vrystaat, Noord- en Noordwes-Kaap en Suidwes-Afrika voor. Die bome vorm dikwels digte ondeurdringbare boskasies. In Suidwes-Afrika is reeds ongeveer 8 miljoen hektaar grond onderhewig aan bosindringing en A. mellifera is die spesie wat veral betrokke is (Van Niekerk 1980). Ebersöhn et al. (1960) beweer dat ongeveer 1 miljoen hektaar grond deur swarthaak in die Molopogebied van Wes-Transvaal ingedring is.

## 2 ALGEMENE ISOLERINGS- EN ANALITIESE METODEDES

Die groot vordering wat die afgelope 30 jaar met die isolering en suiwering van nie-proteïenaminosure gemaak is, is hoofsaaklik te danke aan die gebruik van papier- en ioonuitruilingschromatografie. Die chromatografiese skeiding van aminosure dateer terug na 1941 toe Martin en Synge N-geasetileerde aminosure met behulp van 'n silikajelkolom met chloroform as loopmiddel geskei het. Consden, Gordon en Martin (1944) was die pioniers van tweedimensionele papierchromatografie. Dent et al. (1947) was van die baanbrekers met die skeiding en identifisering van aminosure met behulp van papierchromatografie. Moore en Stein het in 1951 'n baie suksesvolle skeidingstegniek met 'n ioonuitruilingsharskolom (Dowex 50) ontwikkel. In 1958 is ioonuitruilingschromatografie geoutomatiseer (Spackman et al. 1958). Ongeag al die nuwe ontwikkelings bly Moore en Stein se ioonuitruilingschromatografiese skeiding van aminosure die algemeenste en suksesvolste preparatiewe metode (Rosenthal 1982).

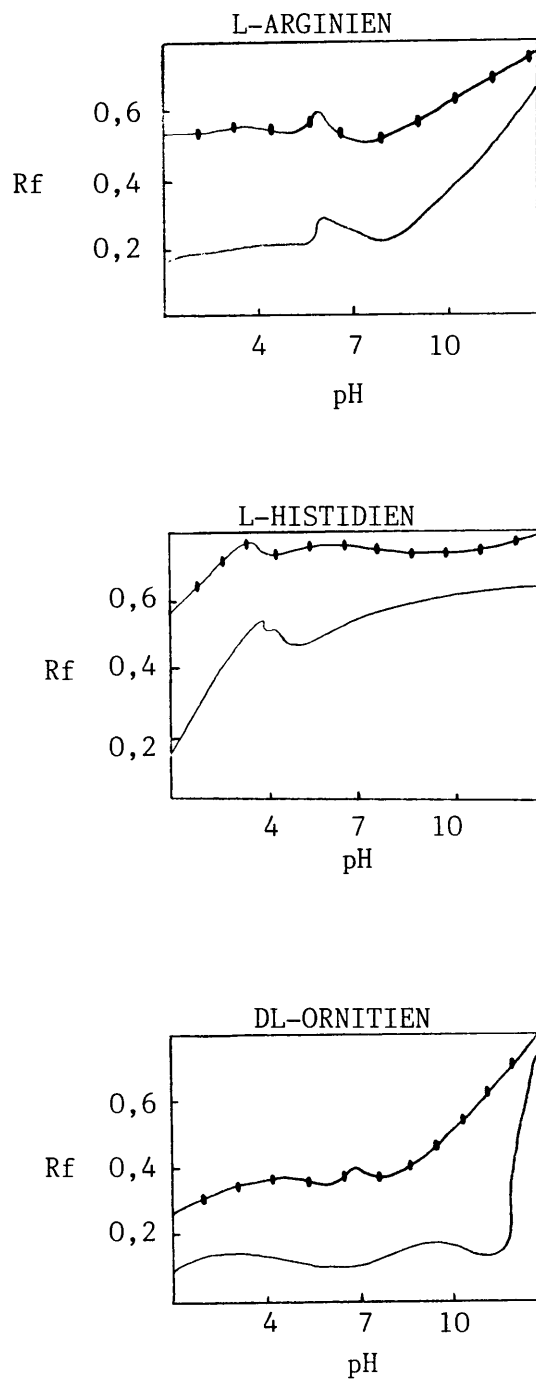
### 2.1 Papierchromatografie

Indien 'n verbinding by 'n kombinasie van gedeeltelik mengbare vloeistowwe gevoeg word, sal dit tussen die gedeeltelik mengbare vloeistowwe verdeel op grond van sy relatiewe oplosbaarheid in die verskillende vloeistofkomponente van die mengsel. Die verhouding van die konsentrasies van die verbinding by ewewig tussen die fases, staan bekend as die verdelingskoëffisient. Papierchromatografie behels in breë trekke die beweging van 'n oplosmiddelsisteem oor 'n stasionêre sellulose-waterfase. Die verbinding wat gechromatografeer word, verdeel tussen die stasionêre sellulose-waterfase en die bewegende oplosmiddelsisteem.

Tydens papierchromatografie beïnvloed verskeie faktore die beweging van die gechromatografeerde verbinding op die papier, byvoorbeeld die soort oplosmiddelsisteem, die pH van die papier en oplosmiddelsisteem, die temperatuur, die konsentrasie van die verbinding wat gechromatografeer word en die geometrie van die papier. Die skeiding wat met sekere loopmiddelsisteme verkry word, word egter min deur die temperatuur beïnvloed byvoorbeeld fenol-ammoniak (Rosenthal 1982). Laundau et al. (1951) het aangetoon dat die Rf-waardes van aminosure noemenswaardig deur die pH van die loopmiddelsisteem beïnvloed word (Figuur 1). Die loopmiddelsisteem van fenol wat met water versadig is, is deur hom gebruik.

## 2.2 Dunlaagchromatografie

Verskeie ondersteuningsmateriale behalwe papier kan in verdelingschromatografie gebruik word. Silikajel, aluminiumoksied, magnesiumsilikaat en geaktiveerde dierkool word as ondersteuningsmateriaal gebruik. Die ondersteuningsmateriaal word as 'n dun laag normaalweg op glas met behulp van 'n bindingsmateriaal soos gips of stysel aangebring. Die adsorpsieoppervlak van dunlaagplate is normaalweg meer eenvormig as die adsorpsieoppervlak van papier. In vergelyking met dieselfde grootte papier is die ontwikkelingstyd van dunlaagplate korter en dus is die grootte van die kol van 'n gechromatografeerde verbinding op 'n dunlaagplaat kleiner as op 'n papierchromatogram omdat die tyd waarin diffusie kan plaasvind, korter is. Om bogenoemde redes is die skeiding van aminosure oor die algemeen beter op dunlaagplate as op papier (Rosenthal 1982).



**Figuur 1** Die Rf-waardes van aminosure met fenol-water as loop-middelsistiem by verskillende pH waardes. Die boonste (—•—•—) en onderste (—) grense van die aminosuurkol word telkens op die papierchromatogram aangedui (Landau et al. 1951).

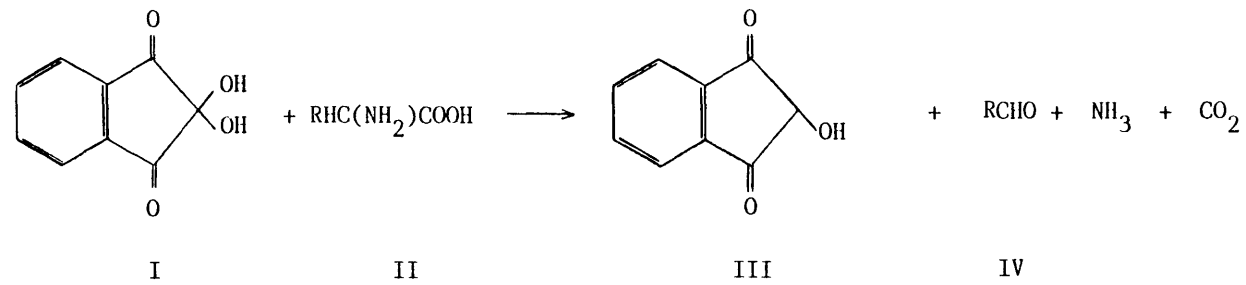


### 2.3 Ninhidrienkleurreaksie

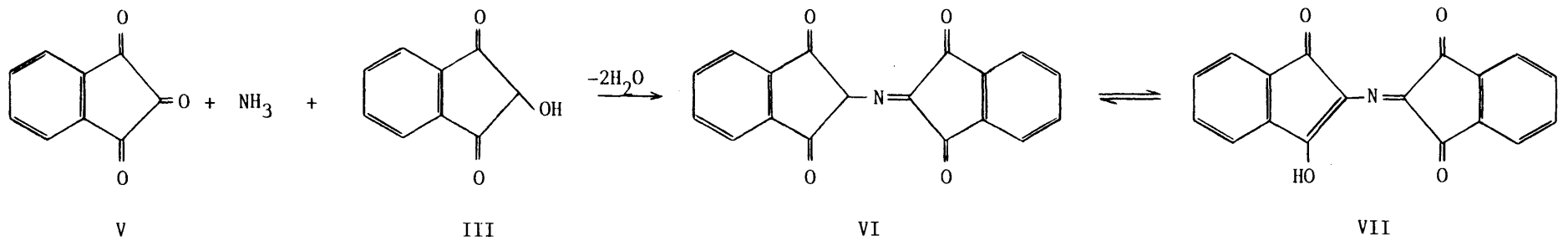
'n Waterige oplossing van meeste aminosure wat in die natuur voorkom is kleurloos en die funksionele groepe van die meeste aminosure absorbeer min ultravioletstraling by golflengtes hoër as 200 nm. Uitgesonder die aromatiese en heterosikliese aminosure, absorbeer die ander aminosure nie straling binne die ultravioletspektrum nie. As gevolg hiervan word 'n kleurproduserende reaksie uitgevoer vir die opwysing van aminosure. Die mees algemeen gebruikte metode is deur 'n ninhidrienoplossing op 'n ontwikkelde chromatogram aan te bring en dan die chromatogram vir 'n paar minute by 'n temperatuur van ongeveer 60°C te verhit. Een tot drie nanomol van 'n aminosuur soos glisien of histidien kan met behulp van die ninhidrienkleurreaksie so gevisualiseer word (Rosenthal 1982).

Ninhidrien (triketohidrindeenhidraat, Figuur 2 (I)) reageer met 'n  $\alpha$ -aminosuur (II) om 'n gekleurde kompleks (VI en VII) te vorm. Dié pers kleur van die gevormde kompleks staan as Ruhemannse-pers bekend en is normaalweg in verskillende skakerings van blou, pers of violet. Ruhemannse-pers het 'n absorpsiemaksimum by 'n golflengte van 570 nm. Dié golflengte het die aanvaarde standaardgolflengte in die analise van aminosure geword.

Koolstofdioksied en water word vrygestel wanneer iminosure (Figuur 3 (II)) met ninhidrien reageer. Sommige van die iminosure vorm geel komplekse met ninhidrien waarvan die maksimum absorpsiepiek by 'n golflengte van 440 nm is.

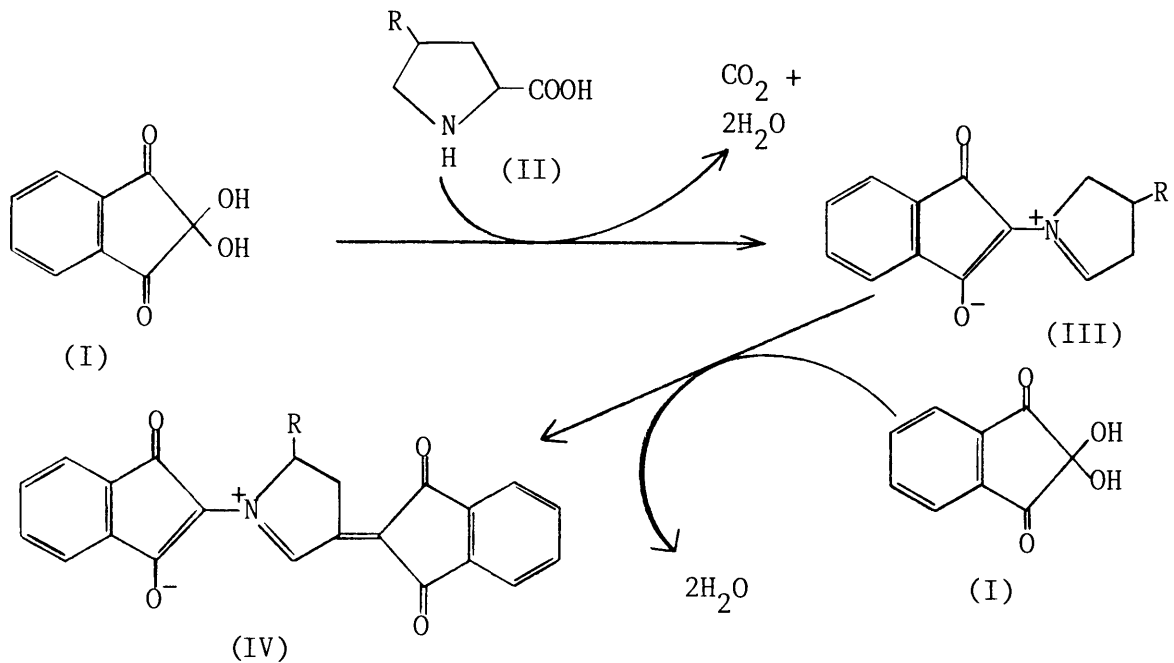


7



Figuur 2 Die ninhidrienkleurreaksie (Hais 1963).

Ninhidrien reageer nie net met  $\alpha$ -aminosure nie maar ook met verbindinge soos primêre en sekondêre amiene (nie tersiêre of aromatiese amiene nie), amino-alkohole, ammoniak en ammoniumsoute.

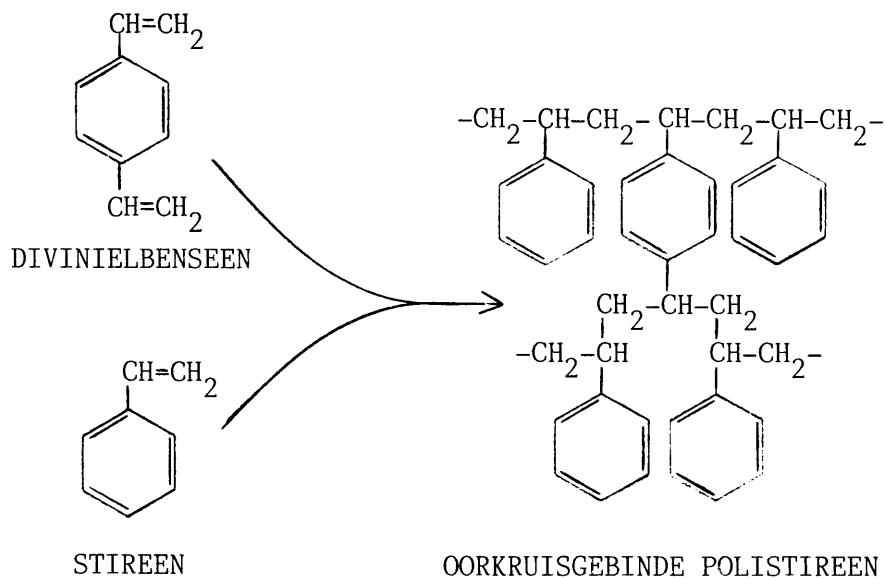


**Figuur 3** Die kleurreaksie van ninhidrien met sommige iminosure (Greenstein & Winitz 1961).

#### 2.4 Ioonuitruilingschromatografie

Ioonuitruilingschromatografie is 'n skeidingsproses waarin daar van onoplosbare polimeriese materiaal met uitruilbare katione of anione daaraan gebind, gebruik gemaak word. Dit is 'n baie effektiewe metode vir die molekulêre skeiding en isolering van verbindinge (Rosenthal 1982). 'n Tipiese ioonuitruilingshars bestaan onder andere uit oorkruisgebinde polistireen wat gesulfoneer is. Die tipe hars is 'n sterk suur uitruilingshars wat  $\text{SO}_3^-$  groepe as deel van die driedimensionele struktuur besit. Die negatief gelaaide groepe bind katione elektrostaties.

Dié katione kan deur ander katione waarvan die konsentrasie hoër is, verplaas word. Dié tipe hars staan kommersieel onder andere as Dowex 50 bekend en word baie algemeen vir die isolering van aminosure gebruik. 'n Katioonuitruilingshars wat minder suur as Dowex 50 is, kan geproduseer word deur 'n swakker suur in die hars te inkorporeer. 'n Alkaliese ionuitruilingshars kan geproduseer word deur byvoorbeeld ammoniumgroepe in 'n oorkruisgebinde polistireen te inkorporeer. Dié tipe hars staan onder andere as Dowex 1 bekend. Polistireen is 'n lineêre polimeer wat in meeste oplosmiddels onoplosbaar is. Deur divinielbenseen by stireen te voeg ontstaan kruisbindings:

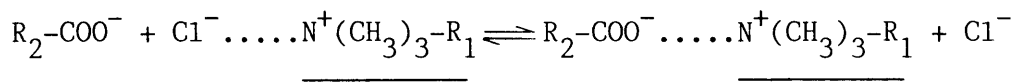
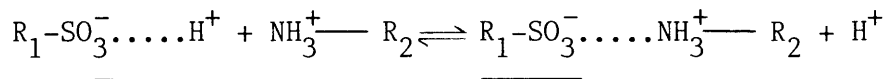


wat veroorsaak dat die hars onoplosbaar is (Williams & Wilson 1975). Die divinielbenseenkonsentrasie van die polimeer bepaal die mate van kruisbindings in die hars. Die konsentrasie daarvan word in die vorm van X-1, X-2, X-4 ens. uitgedruk. Die syfer (1, 2 of 4) is 'n aanduiding van die divinielbenseenkonsentrasie as 'n persentasie van die totale monomeerinhoud. Harse met 4 tot 8% kruisbindings is geskik vir die skeiding van aminosure. Hoe meer kruisbindings in 'n hars voorkom, hoe moeiliker beweeg molekule deur die harskorrels self. Verbindings kan

as gevolg hiervan ook op grond van hul grootte geskei word. Monosaggariede kan byvoorbeeld van polisaggariede op dié wyse deur middel van jelfiltrering geskei word (Rosenthal 1982).

Williams en Wilson (1975) het die meganisme van ionuitruilingschromatografie in vyf stappe verdeel:

- a. Vinnige diffusie van die ioon na die harsoppervlak.
- b. Diffusie van die harsoppervlak na die ionuitruilingsposisie.
- c. Vinnige uitruiling van die labiele-ioon.



waar die onderstreepte molekule die hars voorstel.

- d. Diffusie van die uitgeruilde ioon na die harsoppervlak.
- e. Desorpsie met die elueermiddel en diffusie van die ioon na die oplossing.

## 2.5 Ander isolerings- en analitiese metodes

### 2.5.1 Gaschromatografie

Gaschromatografie behels die skeiding van gasse deur middel van hul verdeling tussen 'n bewegende draergas- en 'n stasionêre vloeistoffase. 'n Inerte gas soos stikstof, helium of argon word normaalweg as draergas gebruik.

Die chromatografiekolom kan van een van verskeie materiale soos glas of vlekvrystaal vervaardig word. Die kolom is normaalweg tussen 1 en 3 meter lank, maar kan selfs tot 100 meter lank wees. Die deursnee van die kolom is normaalweg tussen 2 en 6 mm maar kan selfs tot 30 mm wees. Die temperatuur word tydens die skeidingsproses gereguleer.

Die geëlueerde verbindings word na 'n detektor vervoer waar 'n sein direk eweredig aan die konsentrasie van die geëlueerde verbindings gegenereer word. Die volume draergas wat nodig is om 'n verbinding tot by die detektor te laat beweeg staan as die retensievolume van die verbinding bekend.

Aminosure is polêre, amfoteriese verbindings met hoë smeltpunte en lae dampdrukke. Dit is dus nodig om vlugtige derivate van aminosure te berei voor gaschromatografiese skeiding kan plaasvind (Rosenthal 1982).

### 2.5.2 Elektroforese

Die zwitterioniese eienskappe van aminosure, veroorsaak dat hul in 'n elektriese veld effektief van mekaar geskei kan word. Elektroforese behels die migrering van verbindings as gevolg van 'n toegepaste elektriese veld in 'n geskikte oplosmiddelsisteam wat meestal in 'n ondersteuningsmateriaal soos papier, stysel of silikajel geïmpregneer is. Die beweging van aminosure in 'n elektriese veld is van verskeie veranderlikes soos byvoorbeeld die temperatuur, die pH van die oplos-

middelsisteen, die sterkte van die elektriese veld, die ioniese sterkte en viskositeit van die oplosmiddel afhanklik. Die molekulêre grootte, elektriese lading en vorm van die aminosuur beïnvloed ook die migrering daarvan (Rosenthal 1982).

### 2.5.3 Hoëdruk-vloeistofchromatografie

Dié nuwe tegniek word hoog aangeskryf en as die skeidingstegniek van die toekoms beskou (Rosenthal 1982). Hoëdruk-vloeistofchromatografie het die voordeel dat die verbindings wat geskei word, minder vlugtig as in gaschromatografie hoef te wees. Die groot verskil tussen hoëdruk-vloeistofchromatografie en gaschromatografie is die gebruik van 'n vloeistof in plaas van 'n gas as die elueermiddel. Omdat vloeistowwe baie meer viskoos as gasse is word 'n hoër druk op die kolom in hoëdruk-vloeistofchromatografie as in gaschromatografie toegepas (Knox 1979). Die kolomme wat in hoëdruk-vloeistofchromatografie gebruik word is normaalweg baie kleiner, ongeveer 5 mm in deursnee en 100 tot 250 mm lank. Die druk wat op die kolom toegepas word wissel normaalweg tussen 200 en 2 000 kPa. Soos in gaschromatografie is dit belangrik dat die mobiele fase (vloeistof) en die stasionêre fase (vastestof) nie chemies met mekaar reageer nie (Kaiser & Oelrich 1981).

### 2.5.4 Massaspektroskopie

Die eerste massaspektrometer is in 1919 deur F.W. Aston ontwerp. 'n Massaspektrometer is 'n instrument wat ione kan skei waarvan die massa tot lading ( $m/e$ ) verhouding verskil. Die beginsel waarop die massa-

spektrometer funksioneer, verskil baie van die ander tipes spektrometers. Die monster wat geanaliseer word, word in die dampvorm in 'n geëwakuëerde ruimte met elektrone gebombardeer sodat die verbinding in positiewe ione verander. Die ione van verskillende verbindings het verskillende massa tot lading verhoudings. 'n Elektriese veld versnel die beweging van 'n bundel van die ione deur 'n magnetiese veld. Hoe kleiner die massa tot lading verhouding van 'n ioon, hoe meer verander die magneet die baan van die ioon (Bonner & Castro 1967) en sodoende word die ione met verskillende massa tot lading verhoudings van mekaar geskei.

Die massaspektrometer word dikwels saam met 'n gaschromatograaf vir die analisering van gederivatiseerde aminosure gebruik.

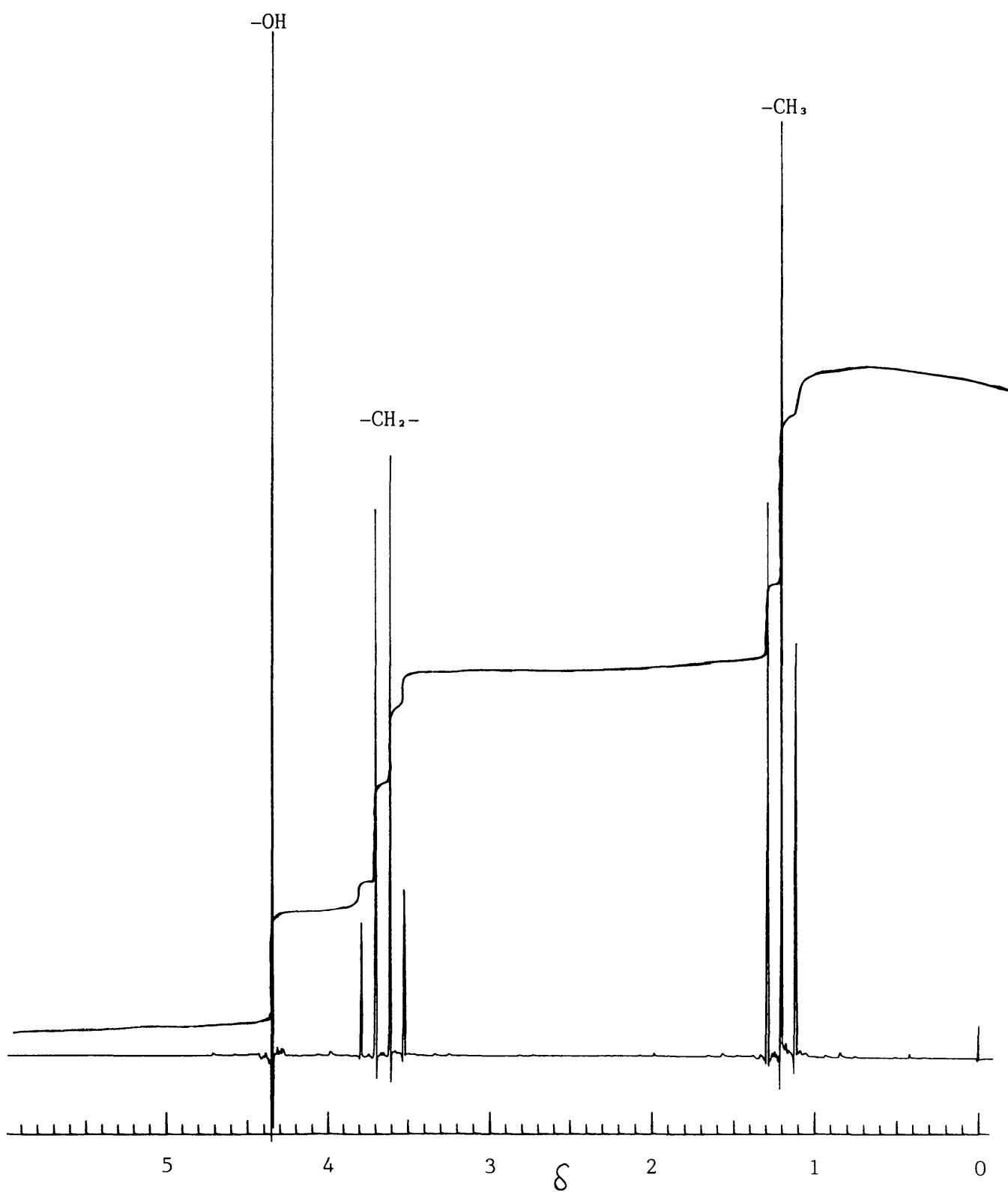
#### 2.5.5 Kernmagnetiese resonansiespektroskopie

F. Block en E.M. Purcell het die Nobelprys in 1952 vir hul uitvinding van die beginsels van kernmagnetiese resonansiespektroskopie ontvang. Die beginsel van kernmagnetiese resonansiespektroskopie verskil van ander tipes spektroskopie daarin dat die kern van die atoom op die bestraling reageer, en nie die hele molekule nie. Al die kerne van isotope met 'n onewe atoommassagetal (bv  $H^1$ ,  $C^{13}$ ,  $N^{15}$ ,  $F^{19}$  ens.) het 'n magnetiese moment langs die rotasie-as. In die teenwoordigheid van 'n magnetiese veld sal die magnetiese momente parallel met die veld oriënteer, in dieselfde rigting of in die teenoorgestelde rigting van die magnetiese veld. Die energieverkil tussen dié twee oriëntasies



is afhanklik van die tipe kern en die sterkte van die magnetiese veld. Die magnetiese momente wat teen die magnetiese veld gerangskik is, is in 'n hoër energievlak as die magnetiese momente wat in dieselfde rigting as die magnetiese veld lê. Deur radiofrekwensie energie in die sisteem te genereer kan van die magnetiese momente wat in dieselfde rigting as die magnetiese veld georiënteer is, teen die rigting van die magnetiese veld heroriënteer. Dié toestand waarin die sisteem nou verkeer, staan as kernmagnetiese resonansie bekend. Die kernmagnetiese resonansiespektrometer bepaal die radiofrekwensiewaarde vir kernmagnetiese resonansie in 'n konstante eksterne magnetiese veld vir 'n atoomkern.

Die rangskikking van die protone in 'n molekule verskil meestal vir verskillende soorte verbindings. Die instrumente in kernmagnetiese resonansiespektroskopie is ingestel sodat slegs die waterstofmagnetiese resonansie bepaal word. Die elektroniese veld waarin die protone verkeer beïnvloed die kernmagnetiese resonansiespektrum van die molekule. Die elektrone rondom 'n proton skerm die eksterne magnetiese veld van die proton af. Dus sal die magnetiese resonansietoestand van die waterstofkern by verskillende magnetiese veldsterktes ingestel word, afhangende van die tipe atoom of atoomgroep waaraan die waterstofatoom gebind is. Die kernmagnetiese resonansiespektrum van etanol is 'n goeie voorbeeld hiervan (Figuur 4). Die kernmagnetiese resonansietoestand word by verskillende magnetiese veldsterktes ingestel, afhangende of die proton in die  $-OH$ ,  $-CH_2-$  of  $-CH_3$  groep voorkom (Bonner & Castro



Figuur 4 Die kernmagnetiese resonansiespektrum van etanol.

1967). Die oppervlakte onder die grafieke is in die verhouding van 1:2:3 wat 'n weerspieëling van die aantal waterstofatome is.

#### 2.5.6 Infrarooispektroskopie

Infrarooispektroskopie is 'n kragtige metode om strukturele inligting omtrent molekule in 'n relatiewe kort tyd (enkele minute) te verkry. Met die meeste ander konvensionele metodes kan dit dae neem. Die absorbansie van infrarooi-straling as gevolg van die vibrasie van molekule word in die spektrale gebied van 5 000 tot 625 golfgetalle ( $\text{cm}^{-1}$ ) bepaal. Die funksionele groepe (byvoorbeeld  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $>\text{C}=\text{C}<$  ens.) van die molekule absorbeer infrarooi-straling by karakteristieke golflengtes (golfgetalle). Die absorbansie van infrarooi-straling deur 'n funksionele groep word deur die atome wat daaraan gebind is beïnvloed. Dit is dus moontlik om uit 'n infrarooispektrum van 'n verbinding af te lei wat die funksionele groepe en die strukturele omgewing om die funksionele groep is (Bonner en Castro 1967).

#### 2.5.7 Ultravioletspektroskopie

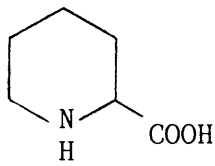
Die ultravioletspektrum kan in twee dele verdeel word naamlik die vakuum - (150 tot 200 nm) en kwartsultravioletgebiede (200 tot 400 nm). 'n Molekuul ondergaan elektroniese opwekking indien stralingsenergie geabsorbeer word. Indien straling in die ultravioletspektrum geabsorbeer word, sal die molekuul 'n tipiese ultraviolet-absorpsiespektrum besit. Onversadigde en aromatiese verbindings absorbeer stralings-

energie in die ultravioletgebied baie sterk. Die spektrale gebied van absorpsie is normaalweg groot (dus is die pieke breed) as gevolg van al die vibrasie-, rotasie- en translasiestoestande wat vir elke molekule moontlik is (Shriner et al. 1967).

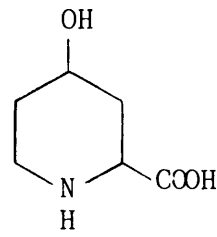
3 DIE NIE-PROTEÏENAMINOSURE IN DIE GENUS ACACIA

In die genus Acacia kom tussen 850 en 900 spesies voor waarvan ongeveer 700 inheems aan Australië en 40 inheems aan Suid-Afrika is sonder dat enige van die inheemse spesies van Australië ook inheems aan Suid-Afrika is (Palmer & Pitman 1972). Die ander spesies kom in die tropiese en subtropiese dele van Afrika, Asië en Amerika voor (Evans et al. 1977). In die sade en organe van baie van die spesies in die genus kom aminosure voor waarvan die verspreiding in die res van die planteryk baie beperk is. Pipekoliensuur (Figuur 5 (formule 1)), 4- en 5-hidroksipipekoliensuur (formules 2 en 3) kom byvoorbeeld tesame in die sade van sommige Acacia-spesies voor terwyl hul verspreiding as groep in die res van die planteryk baie beperk is (Virtanen & Kari 1954, 1955).

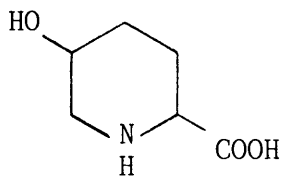
Seneviratne & Fowden (1968b) het die aminosure van 34 van die spesies in die genus ondersoek. Hulle het gevind dat die spesies van die subgenus Gummiferae (dit sluit spesies soos A. erioloba, A. karroo, A. nilotica, A. robusta, A. sieberana en A. tortilis in) kenmerkend N-asetiëldjenkoliensuur (formule 4) en sy sulfoksied bevat, terwyl die Phyllodineae en Botryocephalae (dit sluit hoofsaaklik uitheemse spesies soos A. georginae, A. heterophylla, A. longifolia, A. melanoxyton, A. dealbata en A. mearnsii in) kenmerkend 2-amino-3-ureïdopropionsuur (albizzien) (formule 5), S-karboksietielsisteïen (formule 7) en sy sulfoksied bevat. Baie van die spesies van laasgenoemde twee groepe



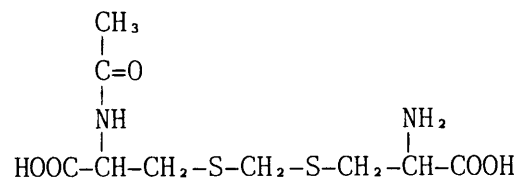
Pipekoliensuur (1)



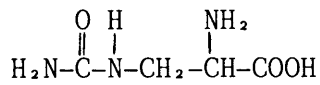
4-Hidroksipipekoliensuur (2)



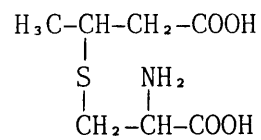
5-Hidroksipipekoliensuur (3)



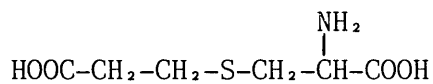
N-Asetieldjenkoliensuur (4)



2-Amino-3-ureïdopropionsuur (5)

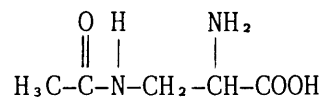


S-Karboksiisopropiëlsisteïen (6)

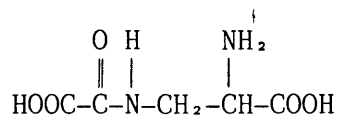


S-Karboksietielsisteïen (7)

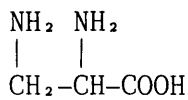
**Figuur 5** Die chemiese strukture van sekere aminosure wat in spesies van die genus Acacia voorkom.



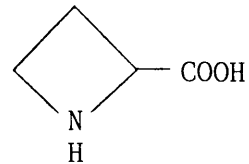
2-Amino-3-asetielaminopropionsuur (8)



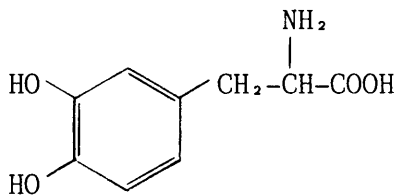
2-Amino-3-oksalielaminopropionsuur (9)



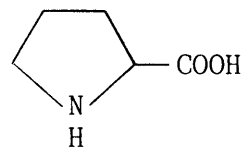
2,3-Diaminopropionsuur (10)



Asetidien-2-karbonsuur (11)



3,4-Dihidroksifenilalanien (12)



Prolien (13)

**Figuur 5 (vervolg)** Die chemiese strukture van sekere aminosure wat in spesies van die genus Acacia voorkom.

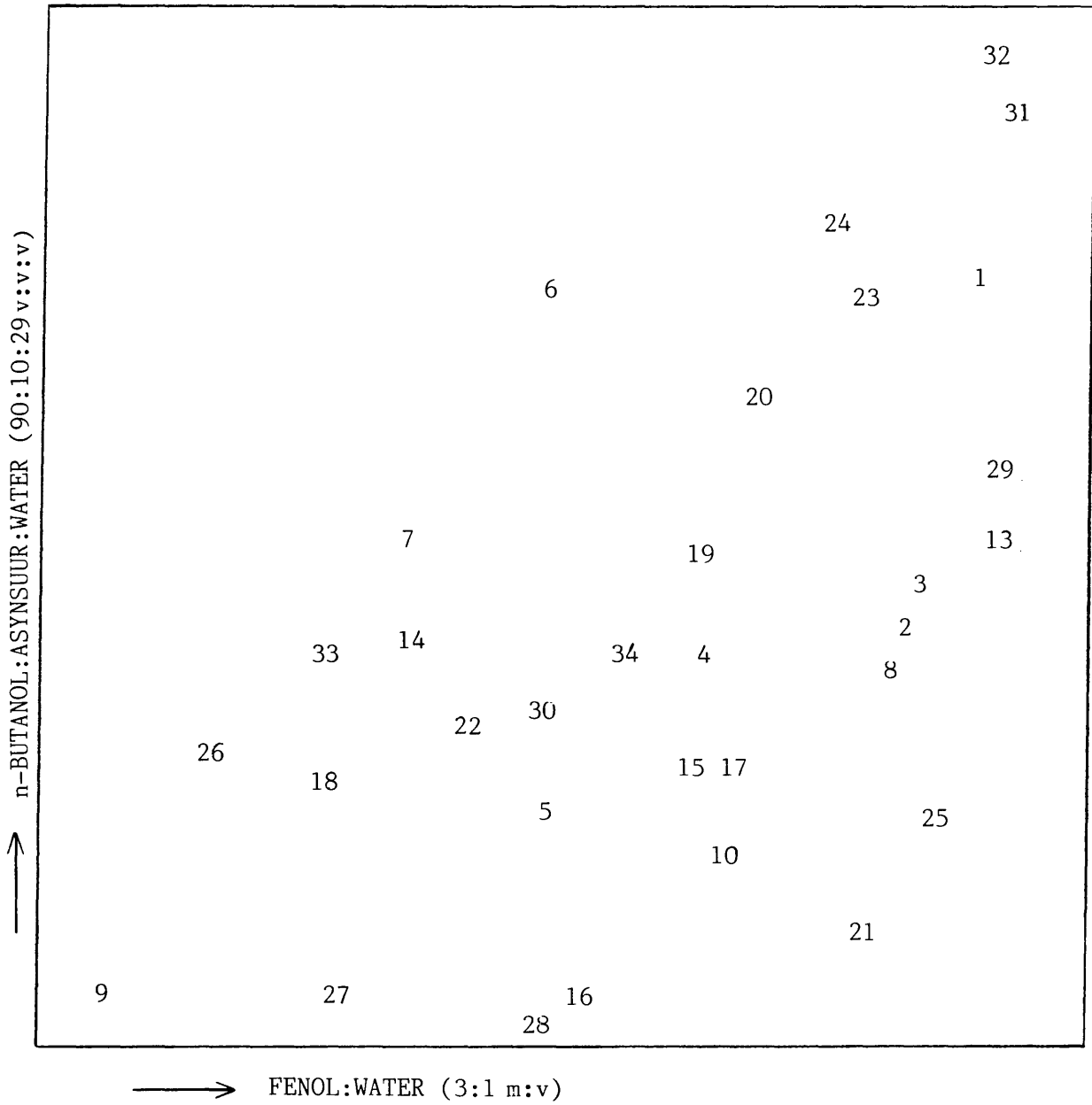
bevat ook S-karboksiisopropiëlsisteëen (formule 6) en 2-amino-3-asetielaminopropionsuur (formule 8). Seneviratne & Fowden het gevind dat sekere van die aminosure so kenmerkend van sekere spesiegroepe is, dat 'n spesie byvoorbeeld in die subgenus Gummiferae geklassifiseer kan word, indien die aminosuur N-asetieldjenkoliënsuur in die spesie voorkom.

Dit is interessant dat 'n spesie soos A. heterophylla wat inheems aan die Mascarene-eilande is, dieselfde aminosure as menige ander spesies van die Gummiferae wat inheems aan Australië is, besit.

Die sade van die subgenus Vulgares (dit sluit spesies soos A. ataxacantha, A. mellifera, A. galpini, A. nigrescens, A. senegal en A. albida in) bevat die kenmerkende aminosure 2,3-diaminopropionsuur (formule 10) en 2-amino-3-oksaliëlamino-propionsuur (formule 9). Laasgenoemde aminosuur kan verlamming in veral die bene van mens en dier veroorsaak (Evans & Bell 1980).

In Figuur 6 word die posisies van sekere van die aminosure wat in die genus Acacia voorkom aangedui soos wat dit op 'n tweedimensionele papierchromatogram (Whatman nr. 1) wat eerstens in fenol:water (3:1) (m:v) en tweedens in n-butanol:asynsuur:water (90:10:29) (v:v:v) ontwikkel is, voorkom. Die kleure wat ontstaan het nadat die papierchromatogram met ninhidrien behandel is (Afdeling 4.2.3), word ook waar moontlik in die figuur aangegee.





### 3.1 Die toksiese eienskappe van die aminosure

#### 3.1.1 Die inhibering van die voeding van sekere insekte

Sommige outeurs beweer dat sekondêre produkte in plante soms mag help om die plante teen potensiële predatore te beskerm (Janzen 1971; Bell 1976). Sommige van hierdie verbindings is toksies in lae konsentrasies terwyl ander soos 3,4-dihidroksifenielalanien (Figuur 5(formule 12)) nuttig aangewend kan word as 'n pynverligter (Evans & Bell 1980). Sekere van die aminosure wat veral in die sade van die genus Acacia voorkom, is giftig vir die larwes van verskeie saadetende kewers (Bell 1976; Janzen et al. 1977). Navon & Bernays (1978) het bevind dat 'n konsentrasie van  $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$  van sekere nie-proteïenaminosure genoeg is om die voeding van die sprinkane Locusta migratoria en Chortoicetes terminifera te inhibeer. Evans & Bell (1979) het ook gevind dat nie-proteïenaminosure wat veral kenmerkend in die sade van baie Acacia spesies voorkom naamlik 2,3-diaminopropionsuur, 2-amino-3-asetielaminopropionsuur en 2-amino-3-oksalielaminopropionsuur ook die voeding van die sprinkaan Anacridium melanorhodon inhibeer. Hulle het ook gevind dat die nie-proteïenaminosure wat in die sade voorkom, voeding meer inhibeer as die nie-proteïenaminosure wat kenmerkend van die blare is. Voorbeelde hiervan is pipekoliensuur, 4-hidroksipipekoliensuur en homoarginien by Chortoicetes terminifera.

Dit wil voorkom asof plante met dié tipe aminosure 'n tipe verdediging teen predatore opbou in die vorm van giftige aminosure.

### 3.1.2 Die inhibering van saadkieming en saailinggroei

Fowden (1963) en Steward et al. (1958) het gevind dat sekere natuurlike nie-proteïenaminosure vir plantsoorte wat dit nie vorm nie, giftig kan wees. Wilson & Bell (1978) het die kieming van die sade en die radikula- en hipokotielgroei van blaarslaaiplante in die teenwoordigheid van sekere nie-proteïenaminosure ondersoek. Hulle het gevind dat 2-amino-3-ureïdopropionsuur en 2-amino-3-oksalielaminopropionsuur reeds teen 'n konsentrasie van  $1 \text{ mol.dm}^{-3}$  saadkieming met 18% en 16% onderskeidelik inhibeer. Teen 'n konsentrasie van  $10 \text{ mol.dm}^{-3}$  word saadkieming deur 2-amino-3-ureïdopropionsuur met 46%, deur 2-amino-3-asetielaminopropionsuur met 47% en deur 2-amino-3-oksalielaminopropionsuur met 30% geïnhibeer. Hulle het ook aangetoon dat 2-amino-3-oksalielaminopropionsuur, 3,4-dihidroksifenielalanien en pipekoliensuur hipokotiel- en/of radikulagroei teen 'n konsentrasie van  $1 \text{ mol.dm}^{-3}$  met ongeveer 50% inhibeer.

Eksperimente wat deur bogenoemde outeurs gedoen is het aangetoon dat blaarslaaisaailinge se groei geïnhibeer word wanneer dit in die teenwoordigheid van sommige peulplantspesies gekweek word. Die blaarslaaisaailinge wou glad nie in die teenwoordigheid van kiemende Glycine wightii-sade wat 2-amino-3-oksalielaminopropionsuur bevat, groei nie. Soos reeds gemeld is, kom laasgenoemde aminosuur algemeen in die sade van verskeie Acacia-spesies voor. Kuo et al. (1982) het gevind dat relatief groot hoeveelhede aminosure deur saailingwortels van ertjies en pronk-ertjies uitgeskei word. Fowden (1963) beweer dat die inhibe-

rende invloed van asetidien-2-karboksielsuur (Figuur 5 (formule 11)) op saailinggroei toegeskryf kan word aan die vervanging van prolien (formule 13) deur dié nie-proteïenaminosuur tydens proteïensintese. Dit is moontlik ook die rede waarom pipekoliensuur (formule 1) hipokotiel- en radikulagroei inhibeer soos wat deur Wilson & Bell (1978) bevind is.

Dit is moontlik dat hierdie giftige nie-proteïenaminosure 'n rol speel in die verskynsel dat sommige Acacia-spesies digte ondeurdringbare stande vorm waarin geen of min ander spesies aangetref word nie. Die betrokke Acacia-spesies is bestand teen die giftige aminosure wat dit sintetiseer maar die kieming en/of saailinggroei van ander plantspesies word deur die giftige aminosure geïnhibeer.

### 3.2 Die biosintese van sekere nie-proteïenaminosure

Omdat die nie-proteïenaminosure in relatief min plantspesies voorkom, is dit moontlik dat hierdie aminosure nie algemene funksies vervul nie. Dit is egter moontlik dat dit 'n rol speel as tussenprodukte in die metabolisme van die proteïenaminosure (Fowden 1966). Daar is tans min bekend oor die metabolisme van meeste van die nie-proteïenaminosure (Bell 1976).

Die nie-proteïenaminosure word deur Bell (1976) in 2 kategorieë op grond van hul struktuur verdeel: dié wat chemiese analoë van die proteïenaminosure is, en dié wat nie chemiese proteïenaminosuuranaloë het nie.

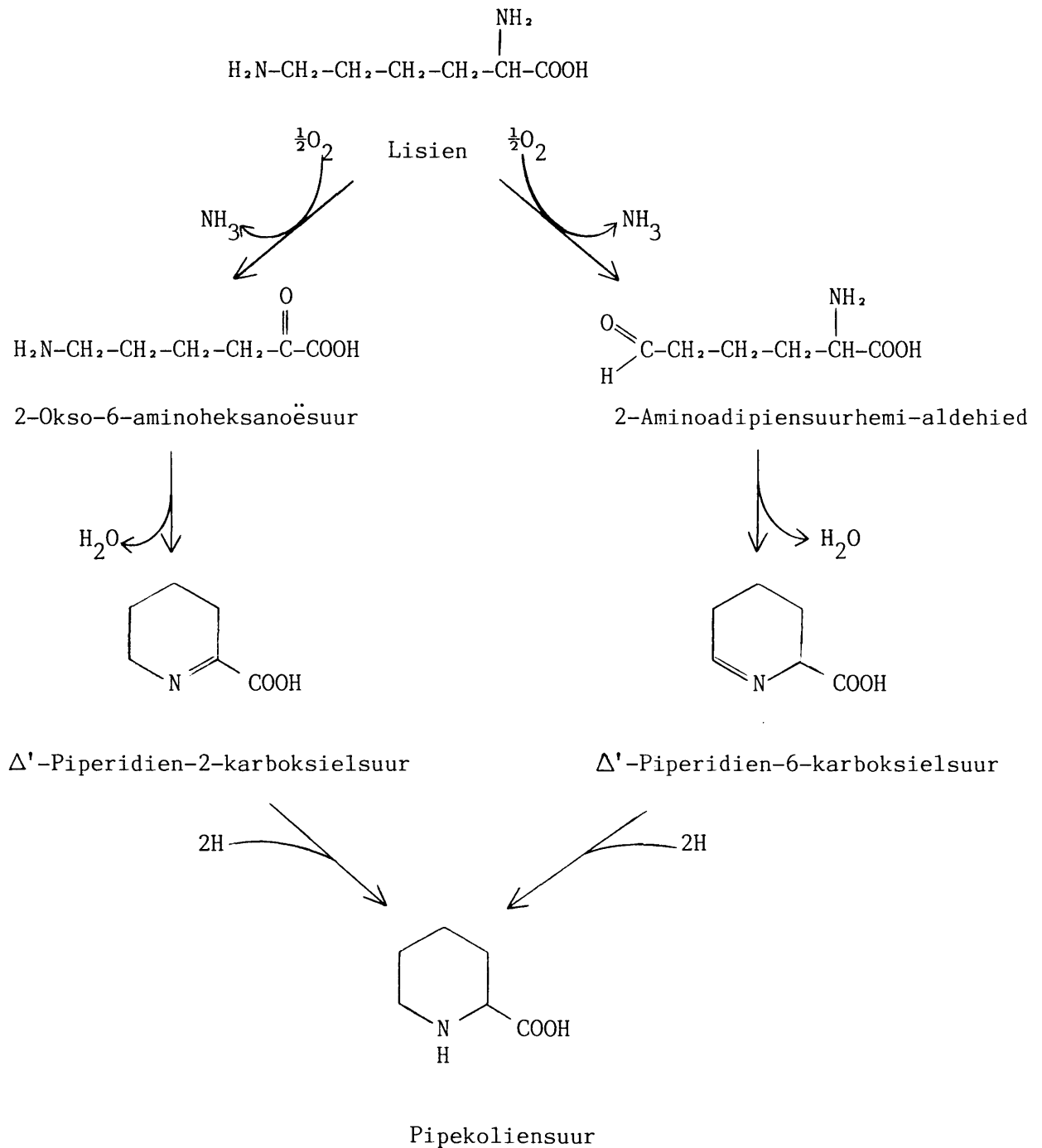
Volgens Bell is daar drie moontlike weë waarvolgens die analoë nie-proteïenaminosure biologies gesintetiseer kan word:

- a. Deur die verandering in die struktuur van die analoë proteïenaminosuur.
- b. Deur 'n verandering in die biosintese van die analoë proteïenaminosuur.
- c. Deur 'n alternatiewe biosintetiese weg as die van die analoë proteïenaminosuur te volg.

Voorbeelde van al drie bogenoemde moontlikhede is reeds bekend.

### 3.2.1 Pipekoliensuur en sy derivate

Pipekoliensuur word baie vinnig uit lisien en moontlik stadiger uit 2-aminoadipiensuur in sommige spesies gesintetiseer (Grobelaar & Steward 1953; Fowden 1960). Lisien word uit aspartiensuur gebiosintetiseer (Rosenthal 1982). Moller (1976) het gevind dat pipekoliensuur nie uit lisien in garsplante gebiosintetiseer word nie. Twee moontlike weë bestaan vir die biosintese van pipekoliensuur uit lisien (Figuur 7). Die eerste weg behels 'n oksidatiewe deaminerings- of 'n transamineringsreaksie gevolg deur ringvorming na  $\Delta'$ -piperidien-2-karboksielsuur en dan reduksie na pipekoliensuur. Die tweede weg behels die vorming van 2-aminoadipiensuurhemialdehid wat ringvorming ondergaan tot  $\Delta'$ -piperidien-6-karboksielsuur en dan vind reduksie tot pipekoliensuur plaas. Gupta & Spencer (1970) en Meister *et al.* (1957) het gevind dat eersgenoemde weg in die biosintese van pipekoliensuur gevolg word. Fowden (1960) se resultate dui daarop dat die tweede weg egter gevolg word.



**Figuur 7** Die twee moontlike weë vir die biosintese van pipekoliësuur vanuit lisien.

Thompson & Moore (1968) het  $^{14}\text{C}$ -gemarkte 5-hidroksi-DL-lisien aan die soetpeul (Gleditsia triacanthos) toegedien en gevind dat 90% van die  $^{14}\text{C}$  in 5-hidroksipipekoliensuur gebind was. Hulle beweer dat 5-hidroksipipekoliensuur uit 5-hidroksilisien en uit pipekoliensuur gebiosintetiseer kan word. Cohen et al. (1956) het daarin geslaag om 5-hidroksipipekoliensuur uit 5-hidroksi-L-lisien te berei. Lindstedt & Lindstedt (1959) het in 'n in vitro sisteem van witrotniere en lewer aangetoon dat 5-hidroksipipekoliensuur uit 5-hidroksi-DL-lisien gebiosintetiseer word.

Fowden (1960) het  $^{14}\text{C}$ -pipekoliensuur aan A. homalophylla toegedien en gevind dat 4-hidroksipipekoliensuur daaruit gevorm is. Hy kon egter nie die biosintese van 4-hidroksipipekoliensuur uit 4-hidroksilisien aantoon nie.

### 3.2.2 2,3-Diaminopropionsuur en sy derivate

Min data oor die biosintese van 2-amino-3-ureïdopropionsuur is bekend. Reinbothe (1962) het gevind dat  $^{14}\text{C}$ -glisien en serien deur Albizzia lophantha in 2-amino-3-ureïdopropionsuur geïnkorporeer word. Rosenthal (1982) postuleer dat laasgenoemde verbinding uit O-asetielserien en ureum gebiosintetiseer word. Fowden et al. (1979) beweer dat 2,3-diaminopropionsuur en 'n ureïdogroep met mekaar reageer om 2-amino-3-ureïdopropionsuur te vorm. Seneviratne & Fowden (1968a) het bevind dat serien nie 'n voorloper in die biosintese van 2-amino-3-ureïdopropionsuur in Acacia podalyriaefolia is nie.

2-Amino-3-asetielaminopropionsuur word uit 2,3-diaminopropionsuur in A. podalyriaefolia, A. armata en A. melanoxyton gebiosintetiseer (Seneviratne & Fowden 1968a).

2-Amino-3-oksalielaminopropionsuur word in Lathyrus sativus uit oksaalsuur en 2,3-diaminopropionsuur gebiosintetiseer (Malathi et al. (1967)).



## 4 MATERIAAL EN METODEDES

### 4.1 Materiaal

1,886 kg blare van Acacia mellifera (Vahl) Benth. subsp. detinens is by die Pretoriase Botaniese Tuin en ongeveer 30 km suid van Warmbad tussen 23 November en 28 Desember 1982 versamel. 'n Verwysingseksemplaar (J.J.M. Meyer 10) van bogenoemde spesie word in die H.G.W.J. Schweickerdt Herbarium van die Universiteit van Pretoria (PRU) gehuisves.

Ongeveer 200 g bloeiwyses van bogenoemde spesie is op 25 September 1981 op Schmidtsdrift (70 km wes van Kimberley) versamel terwyl ongeveer 700 g sade van bogenoemde spesie op 5 Januarie 1982 op Schmidtsdrift versamel is.

### 4.2 Metodes

#### 4.2.1 Ekstrahering van die aminosure uit die blare, sade en blomme

Die aminosure is op dieselfde wyse uit bogenoemde 3 plantdele geëkstraheer alhoewel meeste van die werk op die aminosure wat in die blare van die plant voorkom, gedoen is.

Die plantmateriaal ( $X$  kg) is met  $10X$  dm<sup>3</sup> 70% (v/v) etanol met behulp van 'n ultra turrax gehomogeniseer. Die mengsel (homogenaat) is vir 24 uur meganies geskud waarna dit deur Whatman nr.42 filtreerpapier onder gedeeltelike vakuum gefiltreer is. Die filtraat is met behulp van 'n rolflësindampapparaat onder gedeeltelike vakuum na 'n volume van onge-

veer  $1 \times \text{dm}^3$  gekonsentreer. Die temperatuur van die water in die waterbad was nooit toegelaat om hoër as  $55^\circ\text{C}$  te styg nie. Die neerslag wat tydens die konsentrering van die ekstrak gevorm het, is met behulp van Whatman nr. 42 filtreerpapier onder gedeeltelike vakuüm afgefiltreer en weggegooi nadat vasgestel is dat dit nie noemenswaardige hoeveelhede van enige van die vrye aminosure bevat het nie.

Die aminosure en enige katione in die filtraat is van die anione en neutrale molekule in die oplossing met behulp van 'n ionuitruilingshars geskei. Vir die doel is die ionuitruilingshars Dowex 50W X4, 200–400 droë maas in die waterstofioonvorm gebruik. Die hars (ongeveer  $0,8 \times \text{kg}$ ) is voorberei deur dit met ongeveer  $2,5 \times \text{dm}^3$   $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  soutsuur in 'n 40 cm lange glaskolom met 'n deursnee van 75 mm te was. Ongeveer  $2 \times \text{dm}^3$  water\* is deur die kolom laat loop waarna die pH van die eluaat neutraal was.

Die aminosuurbevattende filtraat is deur die voorbereide hars laat loop waarna die hars met ongeveer  $2,5 \times \text{dm}^3$  water gewas is. Die geadsorbeerde aminosure en katione is vanaf die hars verplaas deur ongeveer  $9 \times \text{dm}^3$  van 'n  $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ammoniumhidroksiedoplossing deur die kolom te laat loop. Die ammoniak in die eluaat is verwyder deur oornag lug deur die oplossing te borrel. Die eluaat is hierna met behulp van 'n rolflësindampapparaat tot 'n volume van ongeveer  $0,5 \times \text{cm}^3$  gekonsentreer.

\* Wanneer daar na water verwys word, word gedistilleerde water deurgaans bedoel.

Die konsentraat is afsonderlik met  $0,25X \text{ cm}^3$  chloroform en  $0,25X \text{ cm}^3$  diëtieleter geëkstraheer. Hierna is dit met aktiewe dierkool (ekstra droog, 1g per  $100 \text{ cm}^3$ -oplossing) behandel en onder gedeeltelike vakuum gefiltreer. Sover met papierchromatografie vasgestel kon word adsorbeer nie een van die aminosure wat in die blare van die plant voorkom aan aktiewe dierkool nie. Die filtraat is gekonsentreer tot 'n volume van  $0,5X \text{ cm}^3$ . Die konsentraat is die aminosuuroplossing genoem.

#### 4.2.2 Stabiliteitstoetse

Die stabiliteit van die aminosure ten opsigte van suur- en alkaliese hidrolise en oksidering met waterstofperoksied, is ondersoek.

'n Volume van  $100 \text{ mm}^3$  van die aminosuuroplossing is by  $100 \text{ mm}^3$   $6 \text{ mol. dm}^{-3}$  soutsuur gevoeg en in 'n glasbuis geplaas wat met behulp van 'n gasvlam toegesmet is. Die verseëelde glasbuis is oornag by 'n temperatuur van  $100^\circ\text{C}$  gelaat. Die oplossing is onder gedeeltelike vakuum deur Whatman nr. 42 filtreerpapier gefiltreer en herhaaldelik drooggedamp nadat water telkens by die hidrolisaat gevoeg is. Die hidrolisaat is hierna na 'n volume van  $100 \text{ mm}^3$  opgemaak. 'n Tweedimensionele papierchromatogram is van die konsentraat gemaak.

Vir die alkaliese hidrolisering is  $100 \text{ mm}^3$  van die aminosuuroplossing by  $100 \text{ mm}^3$  10% (m/v) bariumhidroksied gevoeg en in 'n verseëelde glasbuis by 'n temperatuur van  $100^\circ\text{C}$  oornag gelaat. 'n Volume van  $50 \text{ mm}^3$   $9 \text{ mol. dm}^{-3}$  swawelsuur is by die hidrolisaat gevoeg om die barium as bariumsulfaat te laat presipiteer. Soliede bariumkarbonaat is by die

oplossing gevoeg om die oormaat swawelsuur te neutraliseer. Die oplossing met presipitaat is onder gedeeltelike vakuum deur Whatman nr. 42 filtreerpapier gefiltreer en gekonsentreer tot 'n volume van ongeveer  $100 \text{ mm}^3$ . 'n Tweedimensionele papierchromatogram is van die konsentraat gemaak.

Verder is  $5 \text{ mm}^3$  van die aminosuuroplossing op 'n papierchromatogram met behulp van 'n mikrosput aangebring. 'n Volume van  $15 \text{ mm}^3$  30% (v/v) waterstofperoksied is op die aminosuuroplossing op die papierchromatogram aangebring. Die mengsel is in twee rigtings gechromatografeer.

#### 4.2.3 Papier- en dunlaagchromatografie

Papierchromatografie is deurgaans op Whatman nr. 1-papier gedoen, behalwe waar dit anders gespesifiseer word. Die grootte van die papiere wat gebruik is, was  $230\text{mm} \times 270\text{mm}$ . Die grootte van die papiere wat vir radio-aktiewe werk gebruik is, was  $215\text{mm} \times 265\text{mm}$ . Papierchromatografie is soms in 'n opwaartse en soms in 'n afwaartse rigting uitgevoer. Die chromatografie is in 'n hout-en-glaskabinet van ongeveer  $450\text{mm} \times 320\text{mm} \times 280\text{mm}$  uitgevoer. Goeie skeiding van die aminosure is met 'n mengsel van fenol:water (2,6:1 m/v) en normale-butanol:asynsuur:water (90:10:29 v/v/v) verkry. Na die fenol-water lopie is die chromatogramme oornag in 'n dampkas gedroog terwyl dit na die butanol-asynsuur-water lopie vir ongeveer 4 uur in 'n dampkas gedroog is. Die chromatogramme is na die finale droging met ninhidrien (0,2% (m/v) ninhidrien en 1,0% (v/v) asynsuur in metanol) behandel en vir ongeveer 10 minute by  $60^\circ\text{C}$  verhit.

Dunlaagchromatografie is in 'n opwaartse rigting op voorafvervaardigde Merck 60, F-254 silikajelplate van 200mm x 200mm in glasontwikkelings-tenks van ongeveer 210 mm x 210 mm x 60 mm uitgevoer. Die dunlaagplate is op dieselfde wyse as die papierchromatogramme gedroog. Dieselfde toestande en ninhidrienoplossing is vir die opwysing van die aminosure op die dunlaagchromatogramme gebruik as wat in die geval van papierchromatogramme gebruik is.

Preparatiewe skeiding van die aminosure is op Whatman nr. 3 filtreerpapier van 460mm x 560mm en op silikajeldunlaagplate van 200mm x 200mm (soos hierbo gespesifiseer) gedoen. Die monster is oor die hele breedte van die chromatogram met behulp van 'n mikropipet aangebring. Die chromatogram is eendimensioneel in 'n geskikte loopmiddel ontwikkel.

In die geval van dunlaagchromatografie is 'n verwysingsdunlaagplaat saam met die dunlaagplaat met die "aminosuurband" daarop ontwikkel. Na droging is die verwysingsdunlaagplaat met ninhidrien behandel en die Rf-waardes van die aminosure bereken. Daar is aanvaar dat die Rf-waardes van die aminosure op die verwysingsdunlaagplaat ongeveer dieselfde was as dié van die aminosure op die dunlaagplaat waarop die preparatiewe skeiding gedoen is. Die silikajelband wat na verwagting die aminosuur bevat het wat gesuiwer moes word, is van die preparatiewe chromatogram se glasplaat afgekrap en by 'n klein volume water gevoeg. Die afgekrapte silikajel is 5 keer met water gewas en deur 'n sinterglastregter onder gedeeltelike vakuum gefiltreer. Die filtraat is na 'n klein volume gekonsentreer.

In die geval van papierchromatografie is, na ontwikkeling en droging van die chromatogram 'n 10mm strook aan elke rand en een in die middel oor die lengte van die papier uitgesny en met ninhidrien behandel. Op grond van die resultaat wat met die ninhidrienbehandeling verkry is, is dwarsstroke oor die breedte van die papier uitgesny en die aminosure met water van die stroke af geëluëer. Die eluaat is gefiltreer en tot 'n klein volume gekonsentreer.

#### 4.2.4 Skeiding van die aminosure deur middel van ionuitruilingsharse

##### 4.2.4.1 Voorbereiding van die ionuitruilingsharse

Dowex 50 X4-400, 200-400 droë maas in die waterstofioonvorm is as ionuitruilingshars gebruik. Die metode van Hirs et al. (1952) is as riglyn vir die skeiding van die aminosure gebruik. As toetslopie is  $20 \text{ cm}^3$  van die aminosuuroplossing aanvanklik deur 'n 1,20m lange harskolom met 'n deursnee van 22mm gestuur. Op grond van die resultaat wat verkry is, is besluit om 'n kolom van lengte 1,20m en deursnee 75mm vir die grootskaalse skeiding van die aminosure te gebruik. Hiervoor was 6 kg hars nodig. Die hars is stadig by  $18 \text{ dm}^3 \text{ } 2 \text{ mol. dm}^{-3}$  natriumhidroksied gevoeg terwyl die mengsel aanhoudend geroer is. Die suspensie is vir 5 uur by 'n temperatuur van 60 tot  $70^\circ\text{C}$  geroer. Nadat die oplossing afgekoel en die hars goed uitgesak het, is die bovloei-stof afgegooi. Die hars is twee maal met  $24 \text{ dm}^3$  water omgeroer waarna die hars telkens kans gegee is om af te sak alvorens die water afgegooi is en die hars daarna oornag in  $18 \text{ dm}^3 \text{ } 2 \text{ mol. dm}^{-3}$  natriumhidrok-

sied gelaat is. Meeste van die alkalie is deur 10 spoelings met  $18 \text{ dm}^3$  water op 'n keer verwyder. Die hars is hierna in 'n Büchnertregter met water gewas totdat die pH van die filtraat neutraal was. 'n Volume van  $6 \text{ dm}^3$  van  $4 \text{ mol. dm}^{-3}$  soutsuur is stadig deur die hars laat loop onderwyl die hars nog in die Büchnertregter was. Dit is met  $48 \text{ dm}^3$  van 'n  $2 \text{ mol. dm}^{-3}$  soutsuuroplossing opgevolg om al die natriumione uit die hars te verwyder. Die hars is voorts met water gewas totdat die pH van die deurloop neutraal was. Net voor die kolom gepak is, is die hars in  $15 \text{ dm}^3$  van 'n  $4 \text{ mol. dm}^{-3}$  ammoniumhidroksiedoplossing gesuspendeer en geroer totdat geen hitte meer vrygestel is nie. Die hars is in 'n Büchnertregter eers met  $18 \text{ dm}^3$  water gewas en daarna met  $12 \text{ dm}^3$  van 'n  $0,2 \text{ mol. dm}^{-3}$  ammoniumformiaatbuffer van pH 3,4 gewas. Hierna is  $9 \text{ dm}^3$  van bogenoemde buffer by die hars gevoeg en die mengsel is vir 2 uur laat staan onderwyl dit met tussenposes geroer is om lugborrels uit die suspensie te verwyder. Die kolom is stapsgewys gepak deur telkens genoeg van die harsuspensie by die kolom te voeg om te verseker dat na vassakking dit ongeveer 150mm tot die lengte van die harskolom sou bydra. Nadat die harskolom klaar gepak is, is die ammoniumformiaatbuffer teen 'n tempo van  $200 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$  deur die kolom laat loop totdat die pH van die eluaat dieselfde was as die van die buffer wat bo-op die kolom toegedien is.

#### 4.2.4.2 Voorbereiding en aanbring van die aminosuuroplossing op die ionuiteruilingskolomme

'n Gedeelte ( $230 \text{ cm}^3$ ) van die aminosuuroplossing van die blare (die aminosure van die blomme en sade is nie verder gesuiwer nie) is onder

gedeeltelike vakuüm met behulp van 'n rolflësindampapparaat gekonsentreer totdat dit amper droog was. Dertig  $\text{cm}^3$  van die ammoniumformiaat buffer is by die konsentraat gevoeg om dit minder viskoos te maak. Die aminosuuroplossing in die buffer is versigtig met behulp van 'n druppipet op die kolom aangebring sonder om die oppervlak van die hars te versteur. Nadat die aminosuuroplossing in die kolom inbeweeg het, is addisionele ammoniumformiaatbuffer toegelaat om teen 'n tempo van ongeveer  $30 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$  deur die kolom te vloei.

#### 4.2.4.3 Versameling en analise van die eluaatfraksies

Die eluaat is in 14  $\text{cm}^3$  fraksies in proefbuise met behulp van 'n fraksieversamelaar (LKB Ultrorac 7000) versamel. Omdat ammoniumformiaat self ook 'n positiewe toets met ninhidrien gee, kon druppels van die verskillende fraksies nie direk met ninhidrien op filtreerpapier vir die aanwesigheid van aminosure getoets word nie.

'n Monster ( $5 \text{ mm}^3$ ) van elke derde fraksie is gevolglik eendimensioneel op papier met fenol:water (2,6:1 m/v) as loopmiddel gechromatografeer. Na ontwikkeling is die chromatogram gedroog en met ninhidrien behandel.

#### 4.2.4.4 Verwydering van die buffer uit die aminosuuroplossing

Die verlangde fraksies is bymekaar gevoeg en tot 'n volume van ongeveer  $50 \text{ cm}^3$  gekonsentreer. Die pH van die konsentraat is deur die byvoeging van 'n oplossing van  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ammoniumhidroksied op 6,5 ingestel.



Die oplossing is vervolgens in 'n silindriese fles met 'n ronde bodem met behulp van 'n rolflesindampapparaat gekonsentreer totdat 'n soliede laag materiaal aan die wand van die fles neergeslaan het. Nadat die neerslag goed gedroog is, is 'n koue-vinger versigtig in die silindriese fles geplaas en die fles is deur middel van 'n hoë vakuüm oliepomp geëvakuëer. Deur die fles daarna in 'n waterbad waarvan die temperatuur ongeveer 60°C was, te hou het die ammoniumformiaat gesublimeer en op die koue-vinger in kristallyne vorm gekondenseer. 'n Koueval is in etanol by ongeveer -30°C tussen die sublimeringsfles en die oliepomp geïnstalleer as beskerming vir die pomp. Die sublimering het ongeveer 20 tot 30 uur geneem, afhangende van die hoeveelheid buffer in die gekonsentreerde fraksies. Die gedeeltelike vakuüm is verbreek wanneer geen buffer meer op die koue-vinger neergeslaan het nie. Die aminosure is met warm water uit die sublimeringsfles gespoel en tot 'n klein volume gekonsentreer.

#### 4.2.5 Verdere suiwing van die aminosure met behulp van 'n Sephadexkolom en ultravioletmonitor

Die verdere suiwing van die aminosure is op grond van molekulêre grootte met Sephadex LH-20-100 gedoen. Die Sephadex is gebruik om twee kolomme met deursnee van 10 mm en 22 mm en lengtes van 400 mm en 1 m onderskeidelik te pak. Water of 'n 1:1 v/v water-metanol mengsel is as vloeistoffase gebruik. Ongeveer 1 cm<sup>3</sup> van die aminosuurmonster is versigtig op een van die kolomme aangebring en teen 'n vloeitempo van 15 cm<sup>3</sup> per uur geëluëer. 'n Peristaltiese pomp (LKB 2132 Microperpex)

is vir die doel gebruik. Die eluaat se absorpsie by 206 nm is met behulp van 'n LKB 2138 Uvicord S moniteerder met ultravioletstraling deurlopend gemonitor deur van 'n registreerder (JJ Instruments CR 650A) gebruik te maak. Die fraksies (ongeveer 1 cm<sup>3</sup>) is in 'n fraksie-versamelaar (LKB Super Rac 2211) versamel. Ongeveer 4 mm<sup>3</sup> van elke derde fraksie is op silikajeldunlaagplate (soos voorheen gespesifiseer) met fenol:water (2,6:1 m/v) as loopmiddel gechromatografeer. Die dunlaagplate is na droging met ninhidrien behandel.

Die gesuiwerde aminosure is gekristalliseer deur 97% v/v etanol drups-gewys daarby te voeg.

#### 4.2.6 Identifisering van sekere van die aminosure

In gevalle waar daar vermoed is wat die identiteit van 'n geïsoleerde aminosuur is, en 'n outentieke en suiwer monster van die besondere aminosuur voorhande was, is die twee monsters deur

- (a) papier- en dunlaagchromatografie,
- (b) ninhidrienkleurreaksie,
- (c) massaspektroskopie en
- (d) kernmagnetiese resonansiespektroskopie met mekaar vergelyk. In gevalle waar voldoende materiaal geïsoleer kon word, is die gedrag van die isolaat in 'n outomatiese aminosuuranaliseerder ook met die gedrag van outentieke monsters van sekere aminosure vergelyk.

Die massaspektrums van die aminosure is met behulp van 'n Micromass 16F

massaspektrometer verkry. Kernmagnetiese resonansiespektroskopie is met 'n Brüker WP80 spektrometer gedoen.

Die outomatiese aminosuuranalise is met Waters Associates se outomatiese aminosuuranaliseerder gedoen.

#### 4.2.7 Toediening van radio-aktiewe aminosure aan die blare van Acacia mellifera subsp. detinens

$U-^{14}C$  gemerkte proteïenaminosure is aan die blare van Acacia mellifera toegedien. Die toediening is in 'n fitotronkamer by 'n temperatuur van  $27^{\circ}C$  en 'n ligintensiteit van 170 tot  $200 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$  gedoen. Elke radio-aktiewe aminosuur is aan 6 blare (totale varsmassa ongeveer 0,25g) in glasbuisies met 'n deursnee van 1 mm en lengte van 50 mm toegedien. Die radio-aktiewe aminosuuroplossing is met behulp van 'n mikrospruit in die glasbuisies gespruit waarna die petiool van een blaar (wat onder water afgesny is) in die buis (wat horisontaal gehou is) in die oplossing ingedruk is. Sodra die blaar die oplossing ten volle opgeneem het, is die buisie met water gevul. Water is sodoende aan die blaar voorsien totdat die verlangde blootstellingstydperk verstreke was. Blootstellingstye van 2, 4 en 24 uur is gebruik. Die blare is daarna in 75% v/v etanol geplaas en met 'n stamper en vysel fyngehaal. Die homogenaat is met addisionele 75% etanol verdun en by kamertemperatuur in 'n verseëlde fles gelaat (Fowden & Webb 1958).

Die spesifieke aktiwiteit van die toegediende aminosure was  $3,7 \times 10^{11}$  Bq.  $mol^{-1}$  en die radio-aktiewe konsentrasie  $9,25 \times 10^4$  Bq per  $1 \text{ cm}^3$

oplossing. Ongeveer 40  $\mu\text{g}$  radio-aktiewe aminosuur opgelos in 50  $\text{mm}^3$  water is met ander woorde per 0,25 g vars blaarmassa toegedien. Hierdie toediening stem min of meer ooreen met die toedienings wat Fowden (1960) in soortgelyke proewe gedoen het.

4.2.8 Identifisering en bepaling van die aktiwiteit van die radio-aktiewe aminosure met behulp van radio-outogramme en 'n vloeistofflitsteller

Die ekstrak met die radio-aktiewe aminosure is gefiltreer, drooggedamp en na 'n volume van ongeveer 200  $\text{mm}^3$  met water opgemaak. 'n Volume van 12  $\text{mm}^3$  is op 'n papierchromatogram aangebring en tweedimensioneel gechromatografeer. Die volgende vier loopmiddels is gebruik:

- a. fenol:water (2,6:1 m/v) en  
n-butanol:asynsuur:water (90:10:29 v/v/v)
- b. n-butanol:asynsuur:water (4:1:5 v/v/v) en  
n-butanol:mieresuur:water (15:3:2 v/v/v).

Nadat die chromatogramme gedroog is, is 'n x-straalplaat (Agfa-Gevaert x-straalfilm) in swak rooi veiligheidslig aan elke papierchromatogram vasgekram. Die chromatogramme met hul x-straalplate is vir 2 weke in ligdigte houtkabinette gelaat. Gegalvaniseerde ysterplate (1,5 mm dik) is binne die ligdigte houtkabinette tussen opeenvolgende kombinasies van 'n papierchromatogram en 'n x-straalplaat geplaas. Die x-straalfilms is hierna van die chromatogramme verwyder en ontwikkel terwyl die papierchromatogramme met ninhidrien behandel is en die posisies van die aminosuurkolle daarop met die kolle op die ontwikkelde x-straalplate vergelyk is.

Die aktiwiteit van die radio-aktiewe aminosuurkolle op die papierchromatogramme is met 'n vloeistofflitsteller (Beckman LS-3150T) bepaal. Nadat die posisie van die radio-aktiewe aminosure op die papierchromatogramme met behulp van ninhidrien en die x-straalplate bepaal is, is elke relevante deel van 'n chromatogram uitgesny en opgesny en die papierstukkies vir 24 uur in 10 cm<sup>3</sup> "Aquagel" (Chemlab, Johannesburg) met periodieke opskudding gelaat, waarna die suspensie se aktiwiteit bepaal is, nadat die papierstukkies kans gegee is om af te sak.

#### 4.2.9 Isolering van radio-aktiewe pipekoliensuur

Radio-aktiewe pipekoliensuur is uit die blare wat met radio-aktiewe lisien behandel is, geïsoleer. Tweedimensionele papierchromatogramme is in dieselfde loopmiddels soos wat in afdeling 4.2.8(a) genoem is, ontwikkel. Deur middel van radio-outogramme is vasgestel waar die radio-aktiewe pipekoliensuur op die chromatogramme geleë is. Dié dele van die papierchromatogramme is uitgesny en met water geëlueer. Die verskillende papiere se eluaat is gekombineer en met behulp van 'n rol-flesindampapparaat tot 'n klein volume gekonsentreer. Hierdie radio-aktiewe pipekoliensuuroplossing is op dieselfde wyse as die radio-aktiewe proteïenaminosure (afdeling 4.2.7) aan die blare toegedien en die blare toe soos in afdeling 4.2.7 beskryf is, verder verwerk.

## 5 RESULTATE

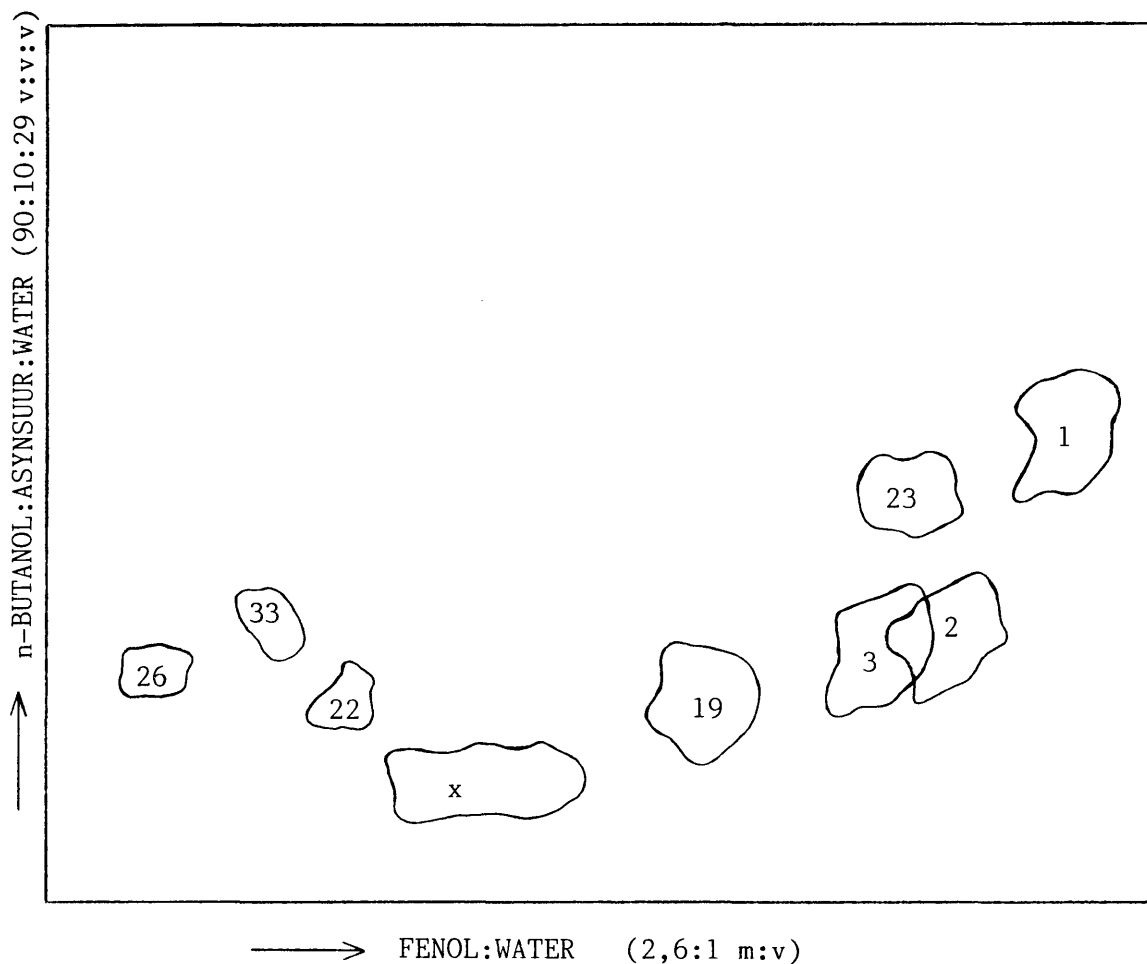
### 5.1 Stabiliteitstoetse

Volgens die R<sub>f</sub>-waardes en die kleurreaksies van die aminosure met ninhidrien op papierchromatogramme het oksidering met 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suur- en alkaliese hidrolise geen invloed op enige van die aminosure wat in die blare van Acacia mellifera voorkom, gehad nie.

### 5.2 Papier- en dunlaagchromatografie

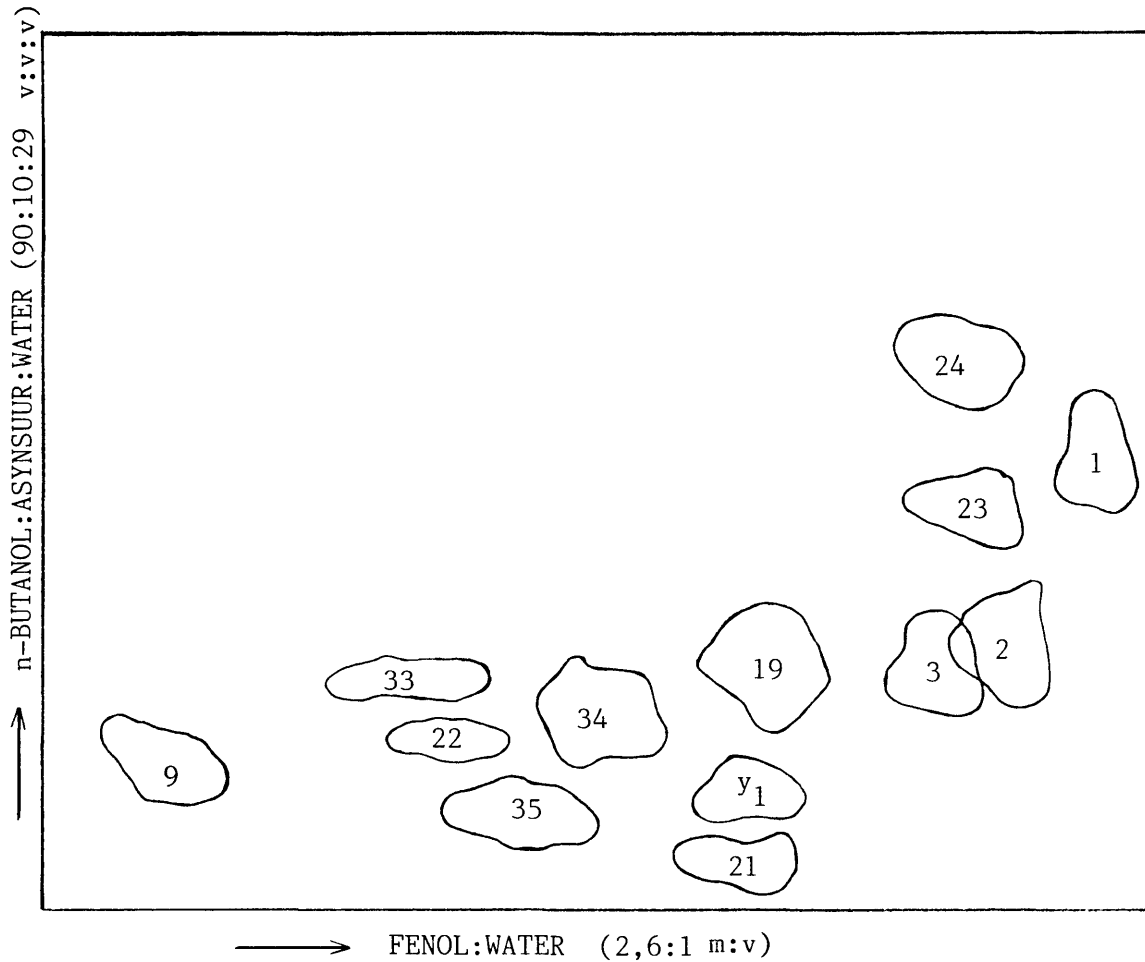
Goeie skeiding van die aminosure is met behulp van tweedimensionele chromatografie met fenol:water (2,6:1 m/v) en n-butanol:asynsuur:water (90:10:29 v/v/v) as loopmiddels verkry. Skematiese voorstellings van die tweedimensionele papierchromatogramme wat met bogenoemde loopmiddels van die aminosure verkry is wat in die blare, bloeiwyses en sade voorkom, word in Figure 7a, 8 en 9 voorgestel.

Aspartiensuur, 2-amino-3-asetielaminopropionsuur, 4-aminobottersuur, 2-amino-3-ureïdopropionsuur, glisien, glutamiensuur, 5-hidroksipipekoliensuur, lisien, serien, en valien is geïdentifiseer deur dit slegs deur middel van papierchromatografie in 4 loopmiddels (afdeling 4.2.8) met die outentieke aminosure te vergelyk. Daar is in teenstelling met wat deur Seneviratne en Fowden (1968b) gepubliseer is, gevind dat 5-hidroksipipekoliensuur 'n groter R<sub>f</sub>-waarde as 4-hidroksipipekoliensuur met fenol-water as loopmiddel het. Die geïsoleerde 5-hidroksipipekoliensuur het dieselfde R<sub>f</sub>-waarde as outentieke 5-hidroksipipekoliensuur in die 4 loopmiddels gehad en het verder ook met isatien gereageer.



**Figuur 7a** 'n Skematiese voorstelling van 'n tweedimensionele papierchromatogram van die aminosure wat in die blare van Acacia mellifera voorkom.

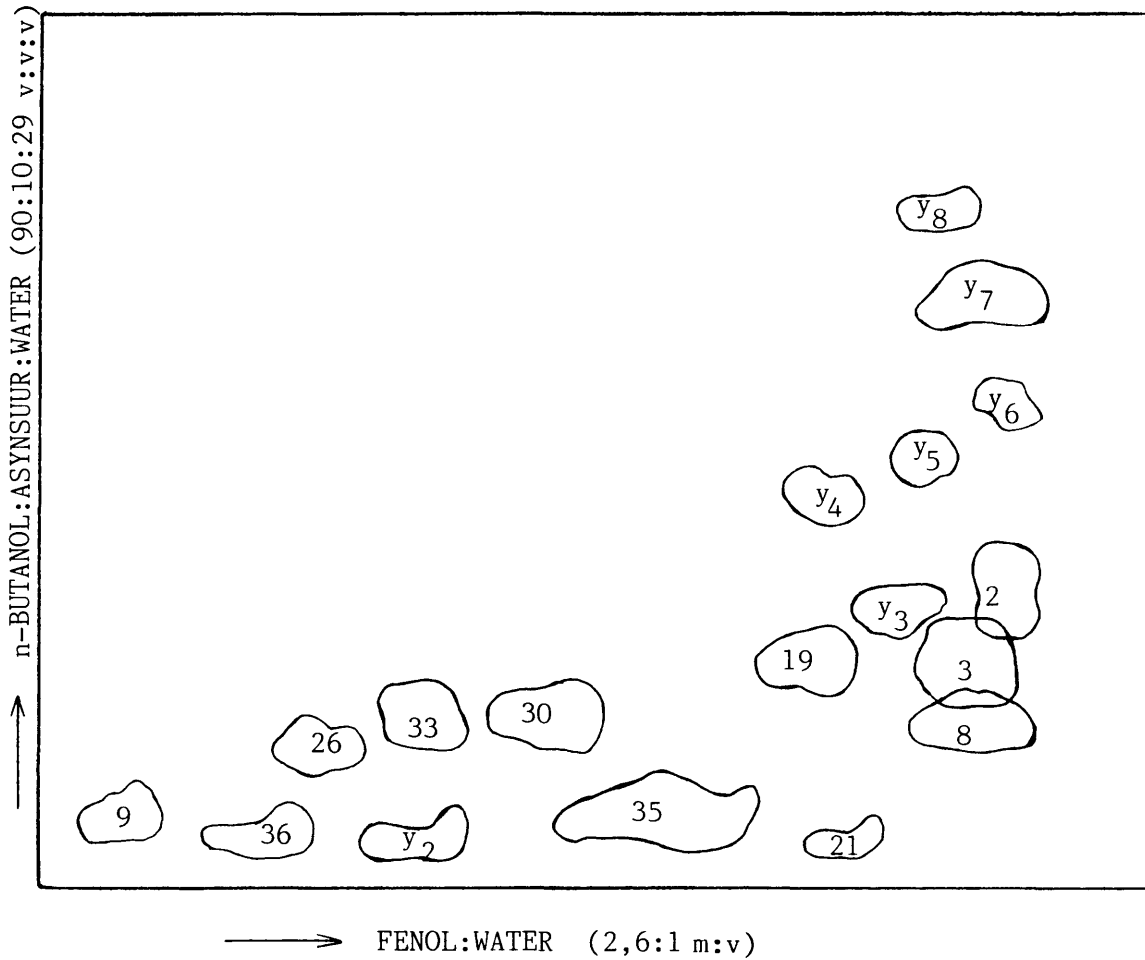
1, Pipekoliensuur; 2, 4-Hidroksipipekoliensuur; 3, 5-Hidroksipipekoliensuur; 19, Alanien; 22, Serien; 23, 4-Aminobottersuur; 26, Aspartiensuur; 33, Glutamiensuur; x, Onbekende.



**Figuur 8** 'n Skematiese voorstelling van 'n tweedimensionele papierchromatogram van die aminosure wat in die bloeiwyses van A. mellifera voorkom.

1, Pipekoliensuur; 2, 4-Hidroksipipekoliensuur; 3, 5-Hidroksipipekoliensuur; 9, 2-Amino-3-oksalielaminopropion-suur; 19, Alanien; 21, Lisien; 22, Serien; 23, 4-Aminobottersuur; 24, Valien; 33, Glutamiensuur; 34, Treonien; 35, Asparagien;  $y_1$ , Onbekende.





**Figuur 9** n Skematiese voorstelling van n tweedimensionele papierchromatogram van die aminosure wat in die sade van A. mellifera voorkom.

2, 4-Hidroksipipekoliensuur; 3, 5-Hidroksipipekoliensuur; 8, 2-Amino-3-asetielaminopropionsuur; 9, 2-Amino-3-oksalielaminopropionsuur; 19, Alanien; 21, Lisien; 26, Aspartiensuur; 30, Glisien; 33, Glutamiensuur; 35, Asparagien; 36, Oksalielalbizzien;  $y_{2-8}$ , Onbekendes.

Die identiteit van 2-amino-3-asetielaminopropionsuur in die sade van die plant is bevestig deurdat dit nie op 'n papierchromatogram opgewys het, nadat die aminosuuroplossing met suur gehidroliseer is nie. Alanien, 4-hidroksipipekoliensuur en pipekoliensuur is geïdentifiseer deur dit te isoleer en die strukture met behulp van kernmagnetiese resonansiespektroskopie, massaspektroskopie en outomatiese aminosuur-analise op te klaar (afdeling 5.5). 2-Amino-3-oksalielaminopropionsuur en oksalielalbizzien is geïdentifiseer met behulp van die kleurreaksie met ninhidrien en Rf-waardes wat in die literatuur gepubliseer is (Hais 1963; Evans 1981 - persoonlike mededeling).

Dit is interessant dat pipekoliensuur wat relatief tot die ander aminosure in 'n hoë konsentrasie in die blare en bloeiwyses voorkom, glad nie met behulp van papierchromatografie en die ninhidrienkleurreaksie in die sade van die plant opgespoor kon word nie. Die onbekende aminosuur x (Figuur 7<sup>a</sup>) wat in 'n relatief hoë konsentrasie in die blare voorkom, kon nie in die bloeiwyses en sade opgespoor word nie.

'n Veel kleiner verskeidenheid aminosure kom in die blare as in die blomme en sade voor.

Die beste skeiding van die aminosure is met fenol:water (2,6:1 m/v) as loopmiddel verkry. Dieselfde gehalte skeiding van die aminosure is deur middel van opwaartse en afwaartse skeiding verkry.

Met dieselfde grootte silikajeldunlaagplate en papierchromatogramme is beter skeiding van die aminosure met die dunlaagplate verkry. Omdat groter papiere as dunlaagplate gebruik kon word, en omdat papiere goedkoper is, is egter hoofsaaklik van papierchromatografie gebruik gemaak.

Goeie skeiding van relatief groot hoeveelhede van die aminosure is op die groot Whatman nr. 3 filtreerpapiere met fenol:water (2,6:1 m/v) as loopmiddel verkry. Die eluering van die papierstroke met water was ook baie doeltreffend.

### 5.3 Isolering van die aminosure met behulp van 'n ioonuitruilingshars

Die aminosuuroplossing is in 2 dele verdeel en die aminosure in elk is afsonderlik deur middel van die kolom gefraksioneer omdat die viskositeit van die onverdunde konsentraat te hoog was en die volume van die minder viskose verdunde oplossing weer te groot was om 'n goeie skeiding deur middel van 'n enkele lopies te verseker.

Die resultate van die twee lopies word in Tabel 1 saamgevat. Die resultate van die twee lopies was ongeveer dieselfde.

Die fraksies (die eerste syfer dui die lopiesnommer en die tweede syfer die fraksienommer aan) is soos volg gekombineer:

- A. Fraksies 1,2 + 2,1 (Aspartiensuur)
- B. Fraksies 1,3 + 2,2 tot 2,5 (Onbekende x)
- C. Fraksies 1,5 tot 1,7 + 2,8 + 2,9 (4-Hidroksipipekoliensuur)
- D. Fraksies 1,9 + 1,10 + 2,7 (Alanien)

**Tabel 1** Die elueringsvolumes van die aminosure uit Dowex 50 ( $H^+$ ) kolomme van lengte 1,2m en deursnee 75 mm.

Fraksie nr.	Elueringsvolume ( $dm^3$ )	Aminosure wat dit bevat het
1,1	3,90 - 4,19	Glutamiensuur
1,2	4,19 - 4,24	Aspartiensuur
1,3	4,24 - 4,90	Aspartiensuur + Onbekende x + Geel-aminosuur*
1,4	4,90 - 5,19	Serien
1,5	5,19 - 5,40	Serien + 4-Hidroksipipekoliensuur
1,6	5,40 - 5,63	4-Hidroksipipekoliensuur + 5-Hidroksipipekoliensuur
1,7	5,63 - 5,80	4-Hidroksipipekoliensuur + 5-Hidroksipipekoliensuur
1,8	5,80 - 5,91	5-Hidroksipipekoliensuur
1,9	5,91 - 6,15	5-Hidroksipipekoliensuur + Alanien
1,10	6,15 - 6,44	Alanien
1,11	7,21 - 7,56	4-Aminobottersuur
1,12	8,12 - 9,21	Pipekoliensuur
2,1	2,67 - 2,70	Aspartiensuur + Glutamiensuur
2,2	2,70 - 2,74	Aspartiensuur + Onbekende x
2,3	2,74 - 3,36	Onbekende x + Geelaminosuur
2,4	3,36 - 3,64	Onbekende x + Geelaminosuur
2,5	3,64 - 4,00	Onbekende x
2,6	4,61 - 5,96	Alanien + Serien + 4-Hidroksipipekoliensuur
2,7	5,96 - 7,41	Alanien + 4-Hidroksipipekoliensuur
2,8	7,41 - 7,70	4-Hidroksipipekoliensuur
2,9	7,70 - 7,74	4-Hidroksipipekoliensuur + 5-Hidroksipipekoliensuur
2,10	7,74 - 8,09	5-Hidroksipipekoliensuur
2,11	8,09 - 8,32	5-Hidroksipipekoliensuur + 4-Aminobottersuur
2,12	8,32 - 9,38	5-Hidroksipipekoliensuur
2,13	10,45 - 11,92	Pipekoliensuur

\* Die geelaminosuur kon nie op 2-dimensionele papier- of dunlaagchromatogramme van die ongefraksioneerde aminosuurekstrakte opgespoor word nie. Dit het moontlik dieselfde  $R_f$ -waarde as alanien in die vier loopmiddels wat gebruik is.

E. Fraksies 1,12 + 2,13 (Pipekoliensuur)

F. Fraksie 1,11 (4-Aminobottersuur)

5.4 Verdere isolering van die aminosure met behulp van 'n Sephadexkolom en ultravioletmonitor

Die soute wat nie met die sublimeringsproses van die aminosure geskei is nie en ander "onsuiwerhede" is verder van die aminosure met behulp van Sephadex LH-20-100 geskei.

Bykans enige organiese verbinding absorbeer straling by 'n golflengte van 206 nm. Dit is dus moontlik om met 'n ultravioletmonitor wat by 'n golflengte van 206 nm opereer, bykans enige organiese verbinding in die eluaat op te spoor.

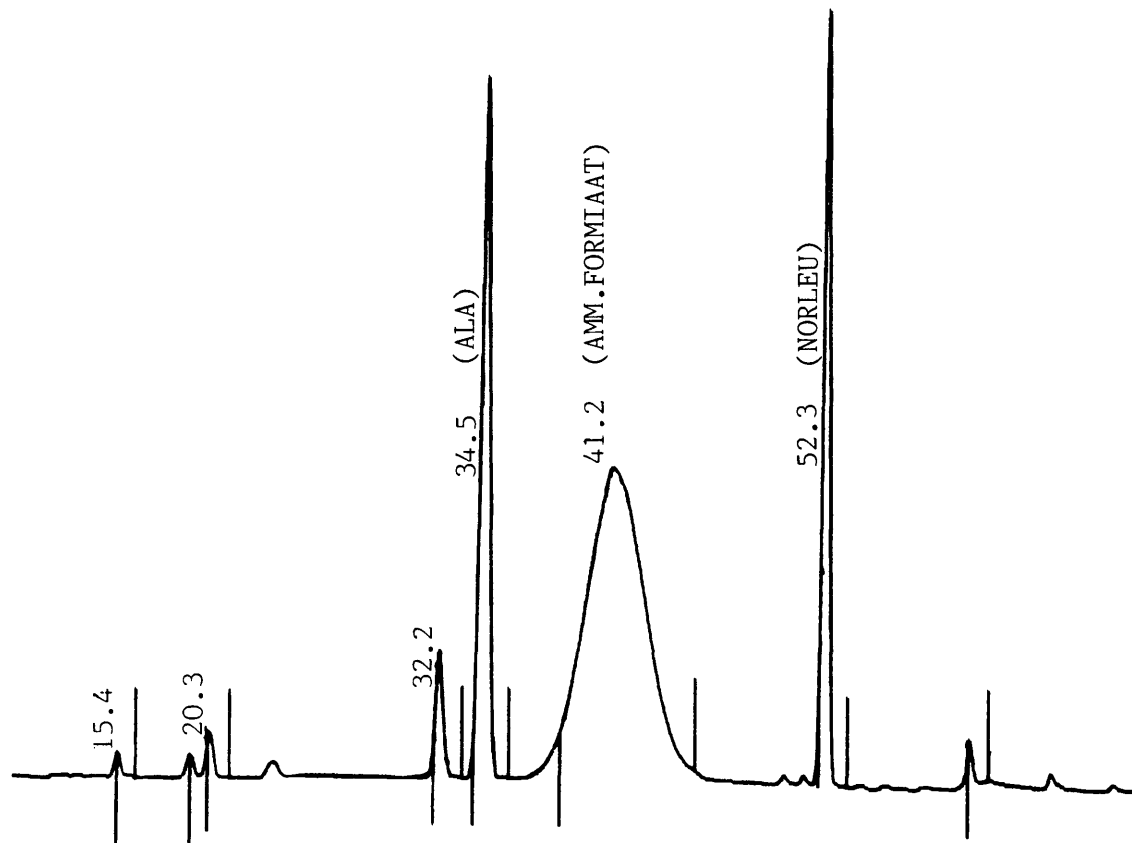
Deur die gekombineerde fraksies herhaaldelik op die kolom aan te bring en die eluaat te fraksioneer is van heelwat onsuiverhede ontslae geraak.

5.5 Identifisering van sekere van die aminosure

Alanien, pipekoliensuur en 4-hidroksipipekoliensuur is in rein kristal-lyne vorm uit die blare van die plant geïsoleer en geïdentifiseer.

Ongeveer 450 mg alanien is geïsoleer. 'n Outomatiese aminosuuranalise (Figuur 10) het bevestig dat die geïsoleerde aminosuur alanien is. Die pieke met retensietye van 41,12 en 52,32 minute is onderskeidelik aan ammoniumformiaat en die interne standaard norleusien toe te skryf.

NAAM	nmol.cm <sup>-3</sup>	OPP.	FAKTOR	RET.TYD
ASP	9.3	25	1.241	15.4
THR	4.7	26	.599	19.2
SER	9.9	48	.695	20.3
GLU	6.9	26	.906	23.5
GLY	14.2	138	.347	32.2
ALA	195.0	822	.799	34.5
AMM.FORMIAAT	32.3	1089	.100	41.2
"	3.5	117	.100	41.3
NORLEU	200.0	648	1.041	52.3

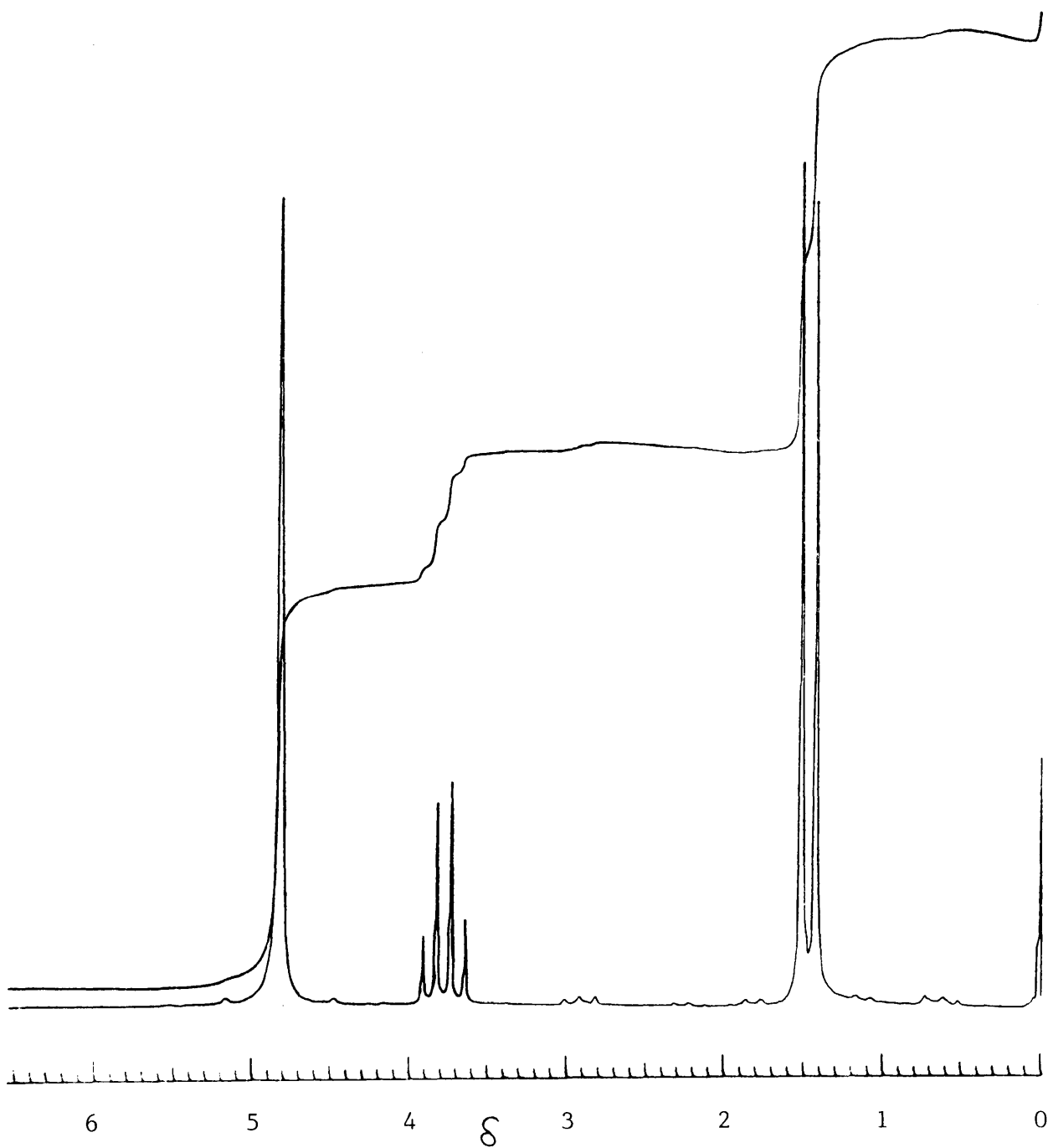


Figuur 10 Die outomatiese aminosuuranalise van alanien.

Die Rf-waardes wat vir geïsoleerde en outentieke alanien met papier- en dunlaagchromatografie verkry is, was dieselfde. Die geïsoleerde en outentieke aminosure se kleurreaksie met ninhidrien was ook identies. Die kernmagnetiese resonansiespektrums (Figure 11 en 12) van geïsoleerde en outentieke alanien verleen addisionele ondersteuning vir die identifisering van die geïsoleerde aminosuur as alanien. Die massaspektrums (Figure 13 en 14) van geïsoleerde en outentieke alanien strook ook met die postulaat dat die geïsoleerde aminosuur alanien is.

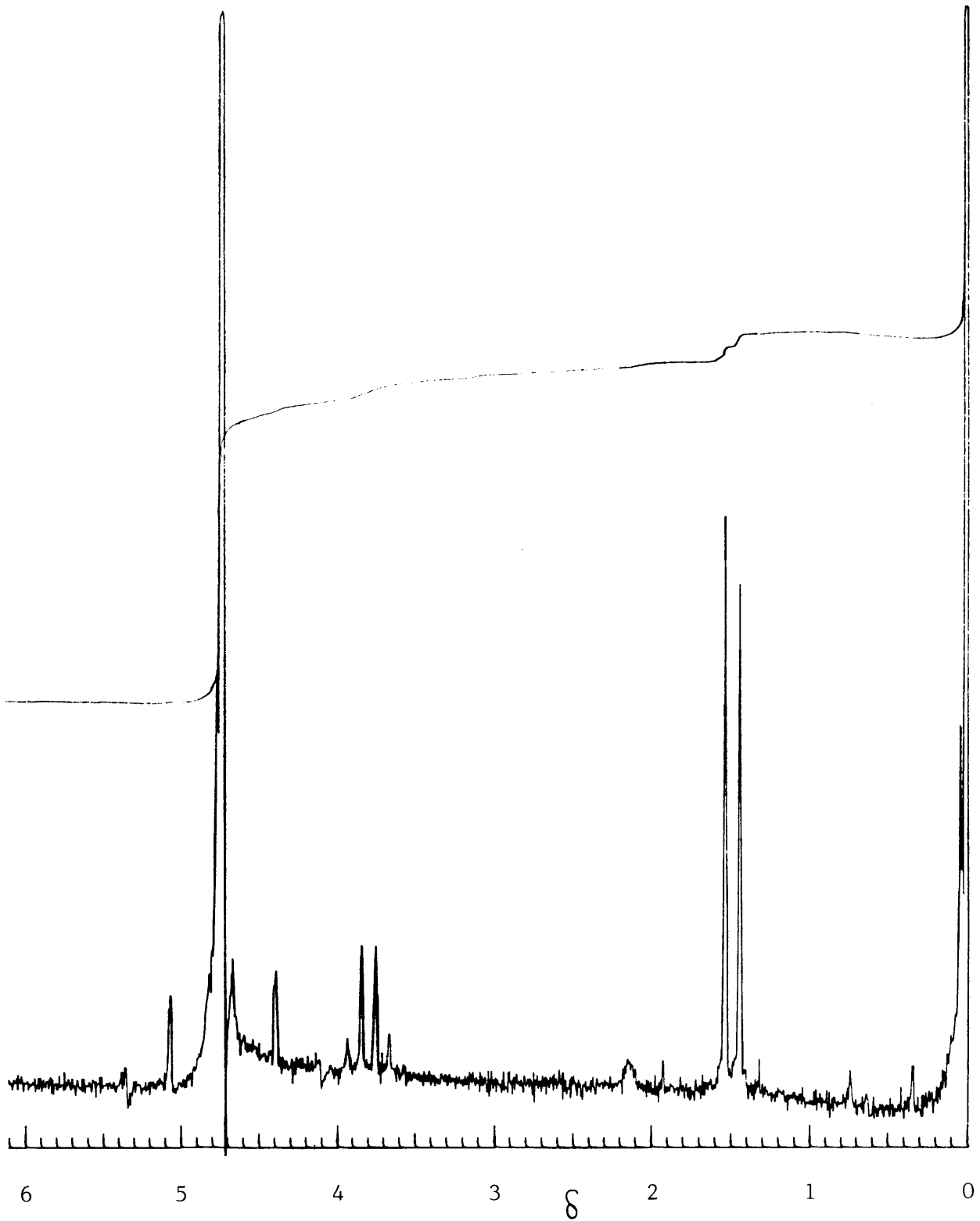
Ongeveer 200 mg pipekoliensuur is uit die blare van die plant geïsoleer. Die resultate van die geïsoleerde en outentieke materiaal wat met papier- en dunlaagchromatografie, die ninhidrienkleurreaksie, kernmagnetiese resonansiespektroskopie (Figure 15 en 16) en massaspektroskopie (Figure 17 en 18) verkry is, ondersteun die aanspraak dat die geïsoleerde aminosuur pipekoliensuur is.

Outentieke materiaal van 4-hidroksipipekoliensuur is nie in die handel beskikbaar nie. Ongeveer 430 mg 4-hidroksipipekoliensuur is uit die blare van die plant geïsoleer. Die resultate van die geïsoleerde aminosuur en data wat in die literatuur verkry is, is dieselfde met papier- en dunlaagchromatografie, die ninhidrienkleurreaksie en kernmagnetiese resonansiespektroskopie (Figuur 19). Die massaspektroskopiespektrum van die geïsoleerde aminosuur dui ook daarop dat dit 4-hidroksipipekoliensuur is (Figuur 20).

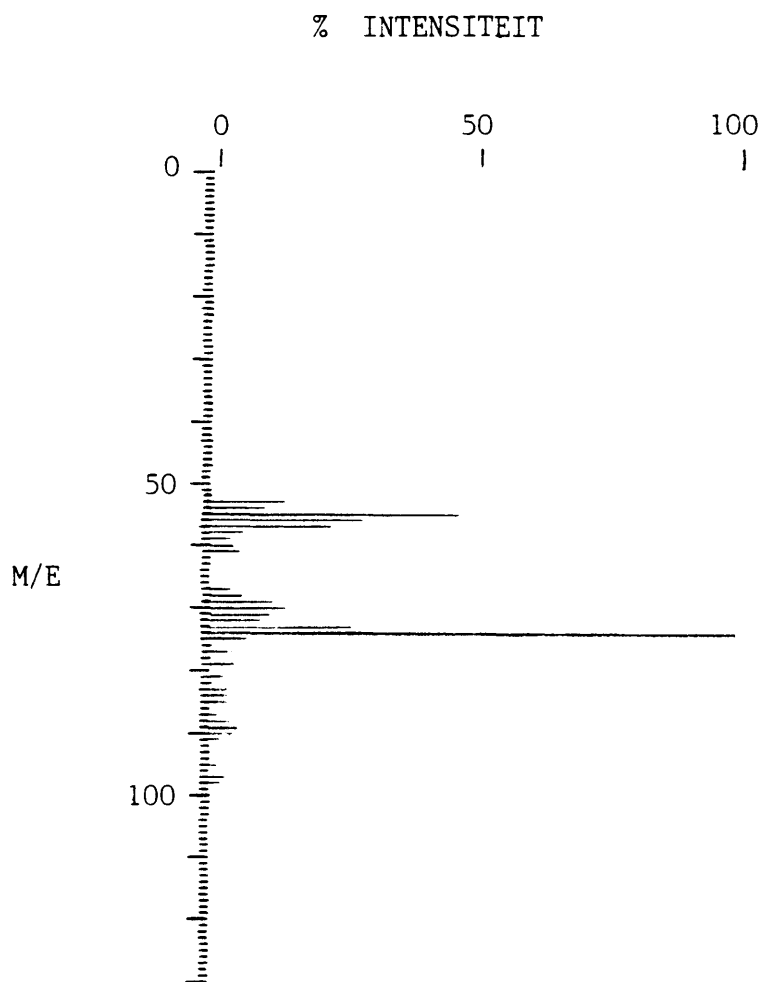


**Figuur 11** Die kernmagnetiese resonansiespektrum van outentieke L-alanien.





Figuur 12 Die kernmagnetiese resonansiespektrum, van geïsoleerde alanien.

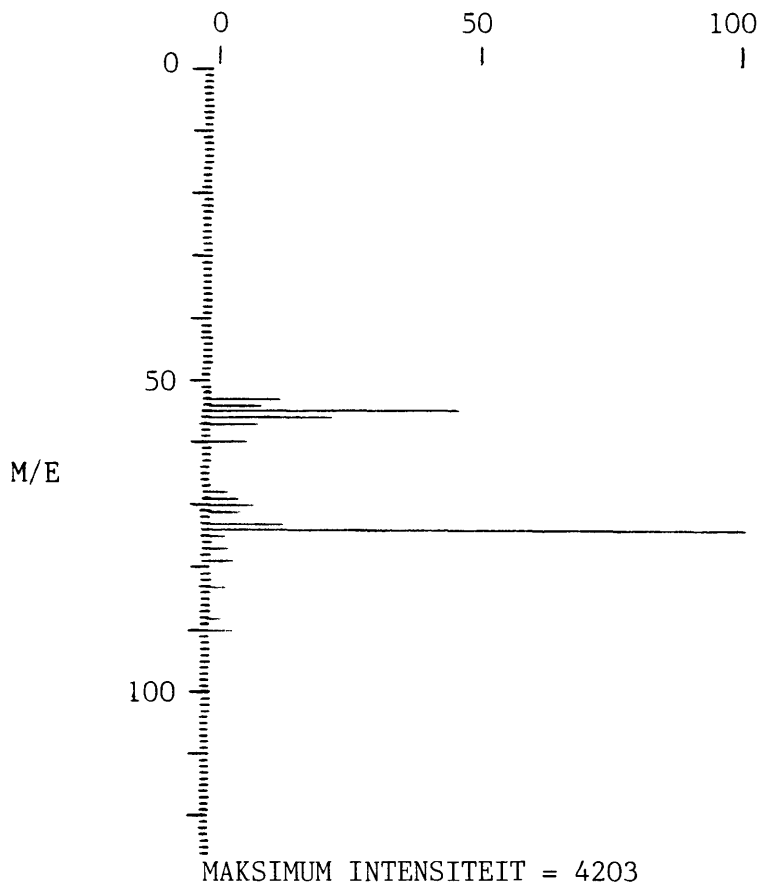


MAKSIMUM INTENSITEIT = 3627

M/E	INT%	M/E	INT%	M/E	INT%
53	12.57	54	7.47	55	44.63
56	18.47	57	7.41	60	4.85
68	2.78	69	5.12	70	6.23
71	3.69	73	12.13	74	100.00
75	2.06	77	1.90	78	0.93
79	2.64	82	0.66	83	2.06
84	0.66	87	0.71	88	3.36
89	1.65	90	3.47	91	1.54
97	0.41	98	0.57	135	2.01

**Figuur 13** Die massaspektrum van outentieke L-alanien.

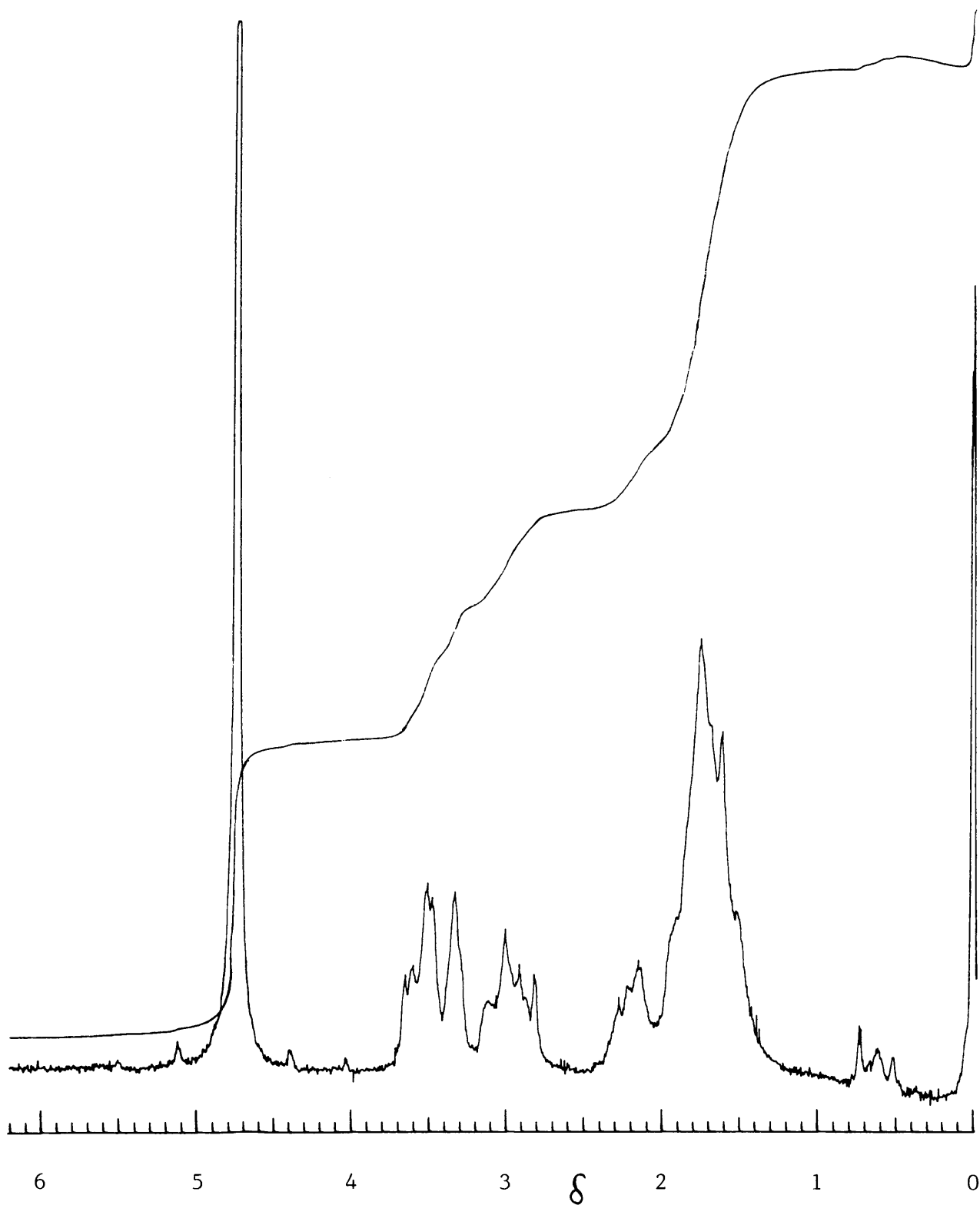
% INTENSITEIT



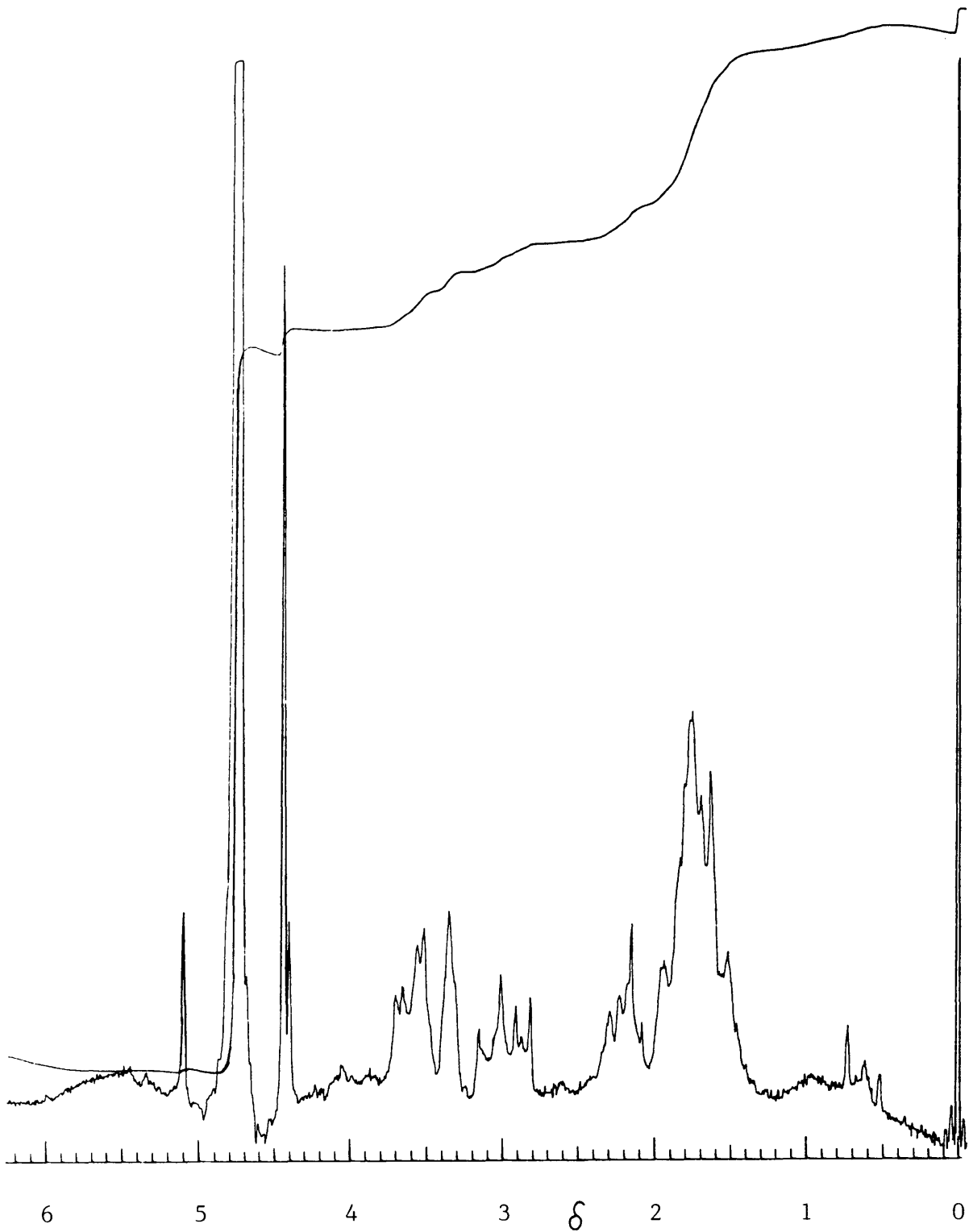
MAKSIMUM INTENSITEIT = 4203

M/E	INT%	M/E	INT%	M/E	INT%
53	14.10	54	8.08	55	51.84
56	24.41	57	19.96	58	3.21
59	2.14	60	29.64	61	3.33
64	1.80	65	0.68	66	0.45
67	3.80	68	4.68	69	10.46
70	13.77	71	9.32	72	7.89
73	20.60	74	100.00	75	4.56
76	0.99	77	3.54	78	1.66
79	3.18	80	0.78	81	3.04
82	1.42	83	5.40	84	3.87
85	3.94	86	1.35	87	2.61
88	3.33	89	3.92	90	3.83
91	2.33	94	1.18	95	1.57
97	4.09	98	2.68	99	0.80
100	1.04	101	0.76	105	2.40
106	0.40	107	1.33	111	1.66
112	0.83	113	0.66	115	1.85
121	1.09	129	3.09	133	0.71
135	2.28	185	0.64	197	1.21
313	0.76				

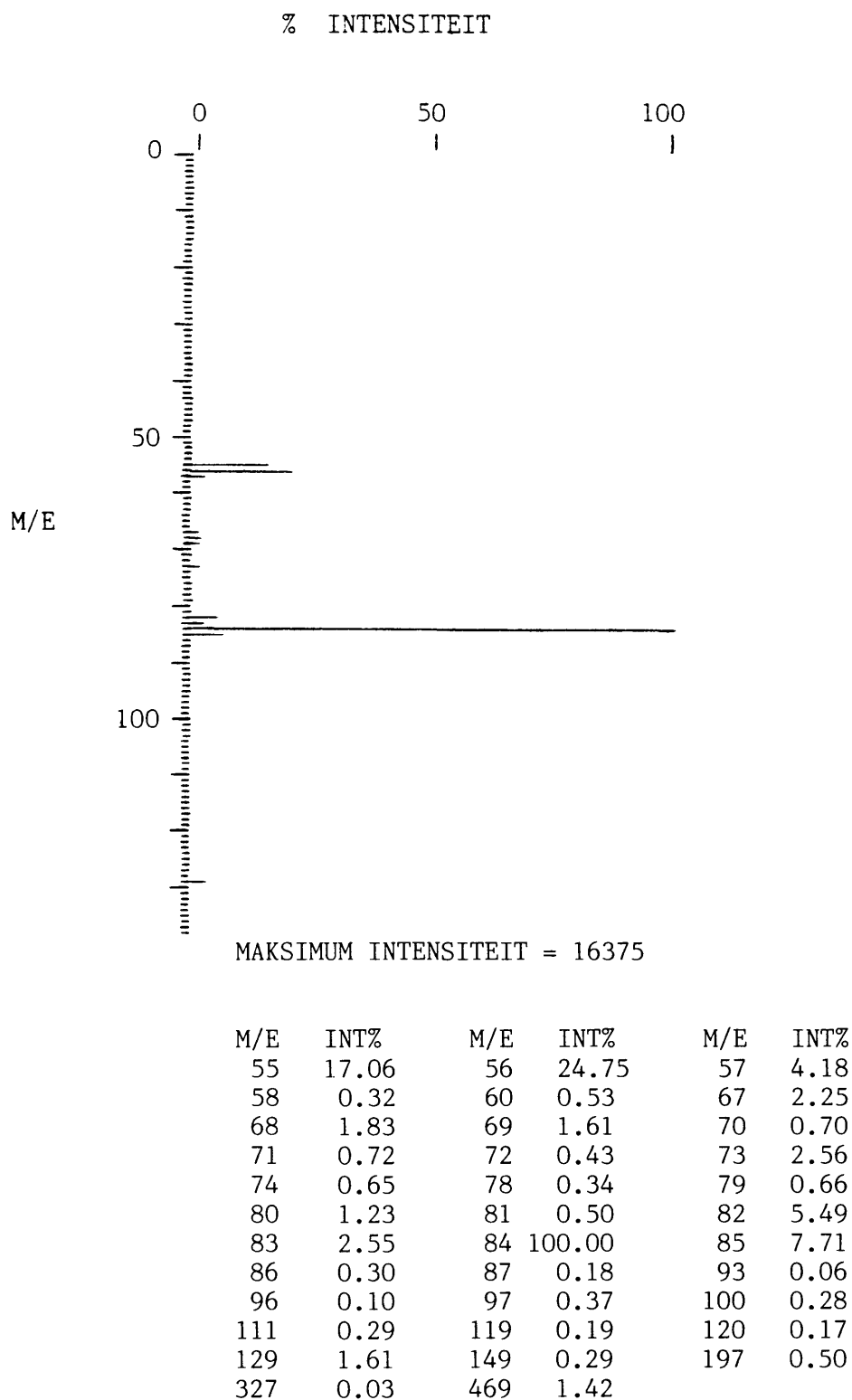
Figuur 14 Die massaspektrum van die geïsoleerde alanien.



**Figuur 15** Die kernmagnetiese resonansiespektrum van outentieke L-pipekoliensuur.

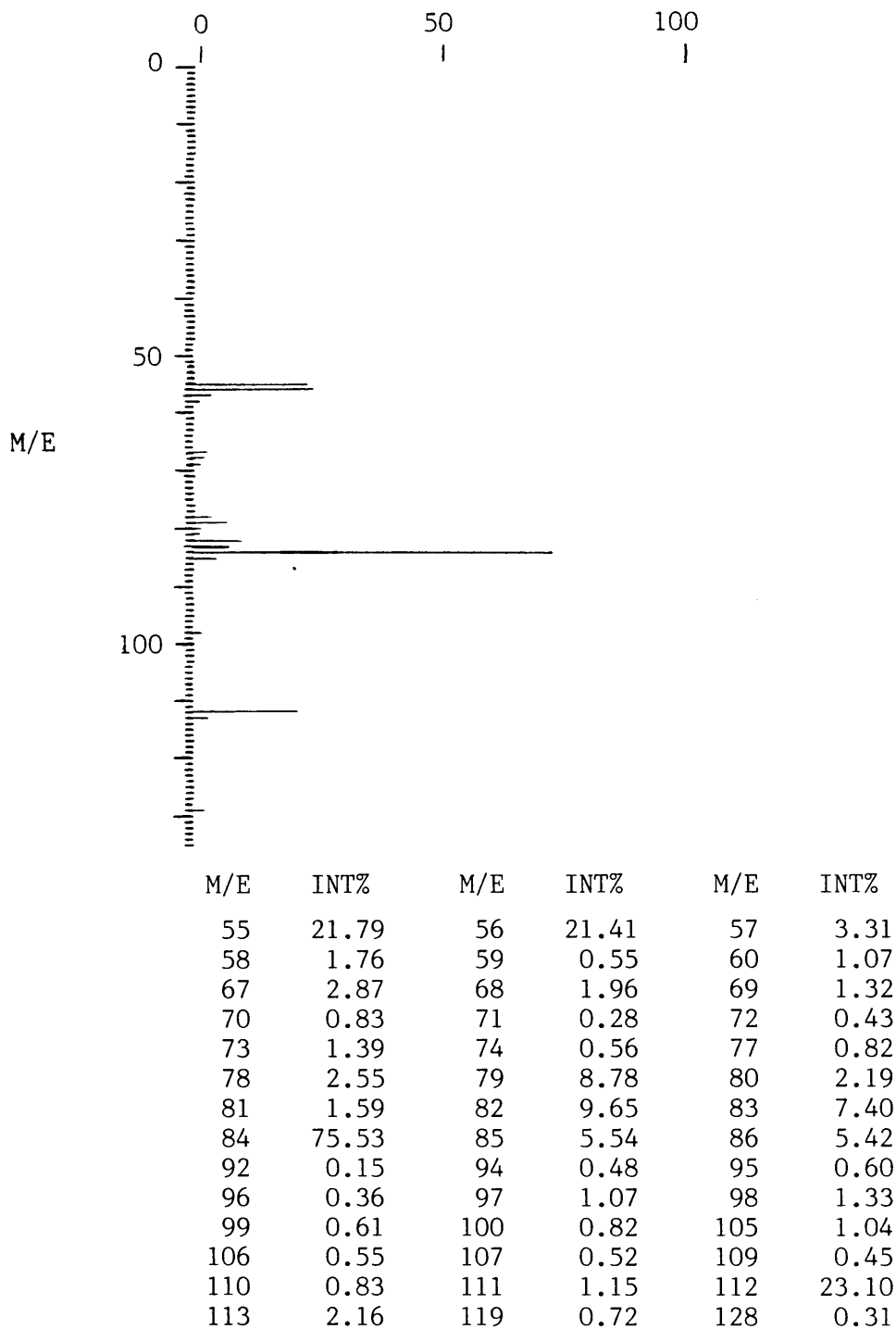


**Figuur 16** Die kernmagnetiese resonansiespektrum van die geïsoleerde pipekoliensuur.

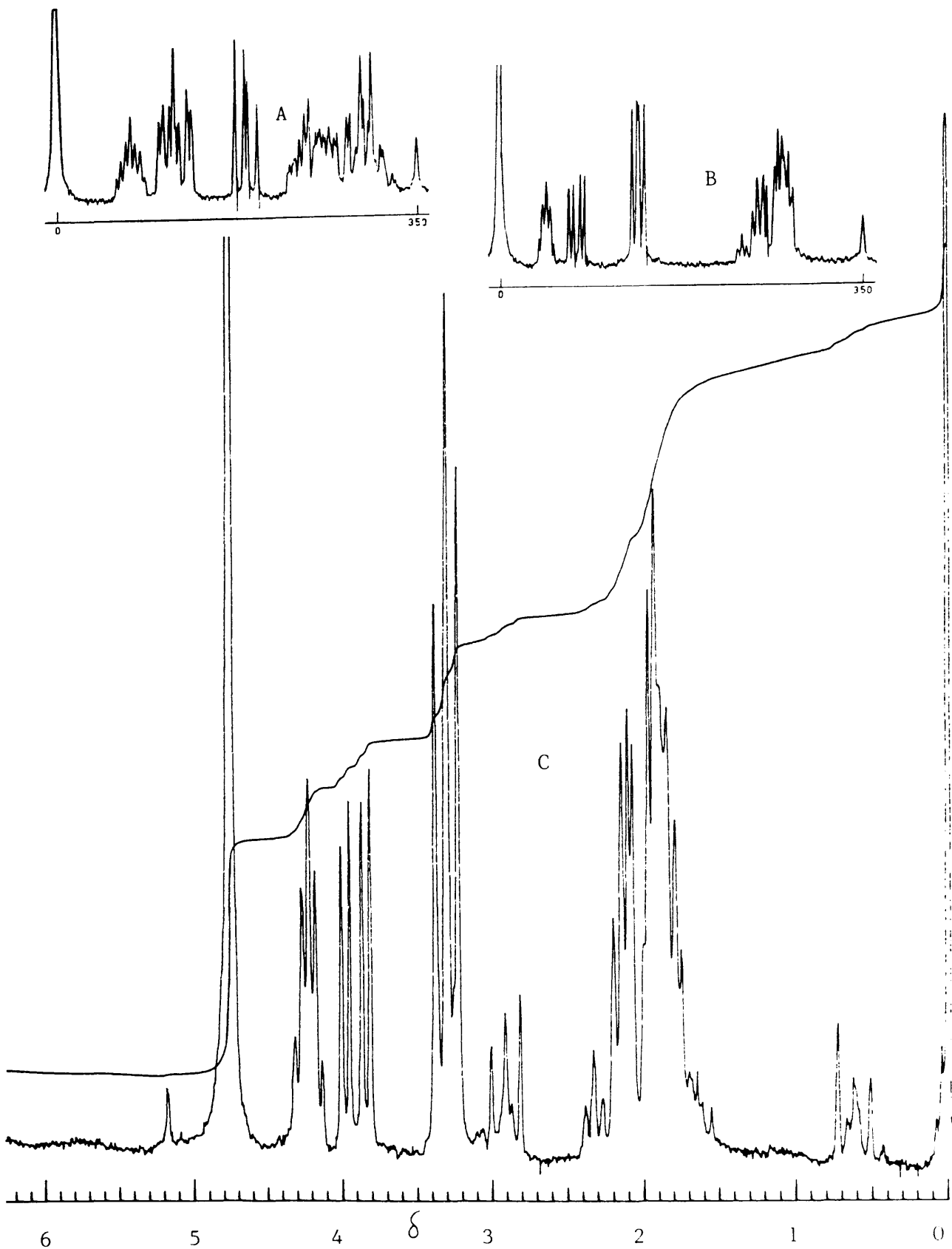


**Figuur 17** Die massaspektrum van outentieke L-pipekoliensuur.

% INTENSITEIT



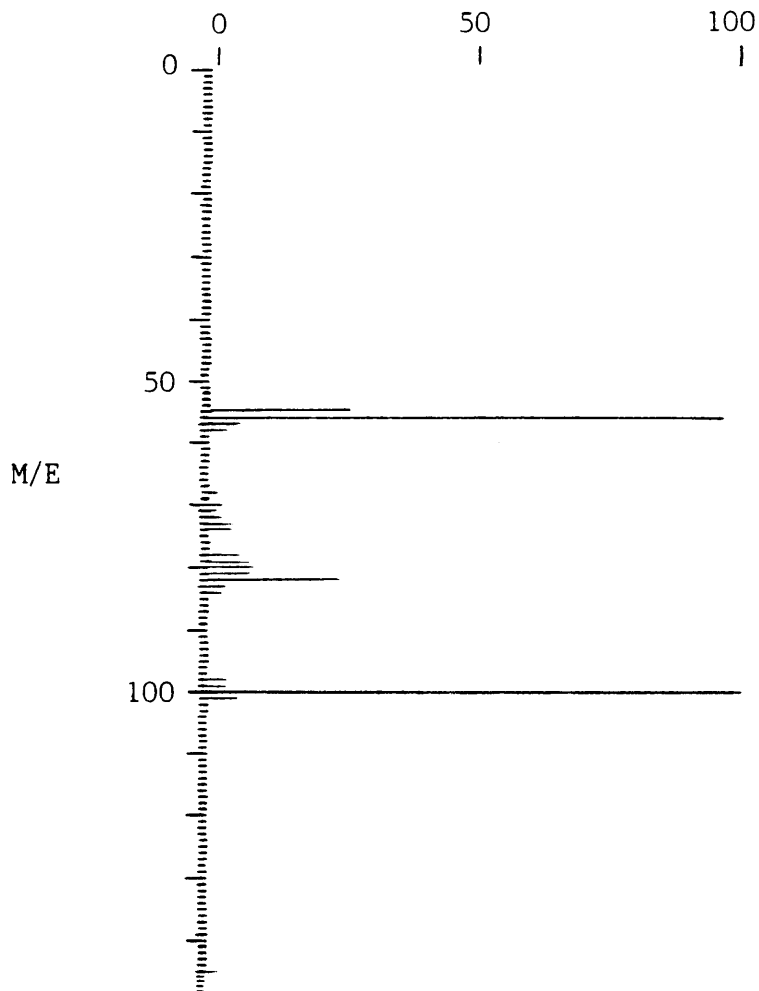
**Figuur 18** Die massaspektrum van die geïsoleerde pipekoliensuur.



Figuur 19 Die kernmagnetiese resonansiespektrums van (A) outentieke 5-hidroksipipekoliensuur, (B) outentieke 4-hidroksipipekoliensuur (Shoolery & Virtanen 1963) en (C) geïsoleerde 4-hidroksipipekoliensuur.



% INTENSITEIT



MAKSIMUM INTENSITEIT = 11003

M/E	INT%	M/E	INT%	M/E	INT%
55	22.80	56	98.55	57	7.05
58	4.26	67	0.97	68	2.50
69	1.10	70	2.90	71	2.00
72	3.68	73	3.70	74	1.56
76	0.27	78	6.28	79	7.67
80	8.60	81	7.47	82	24.23
83	3.75	84	2.42	85	0.28
86	0.79	88	0.26	94	0.38
96	0.28	97	0.33	98	2.97
99	2.95	100	100.00	101	6.05
102	0.22	106	0.37	109	0.36
110	0.41	111	0.46	112	0.16

**Figuur 20** Die massaspektrum van die geïsoleerde 4-hidroksipipekoliensuur.

## 5.6 Biosintese van sekere van die aminosure

Die aktiwiteit van die aminosure wat gemerk geraak het na toediening van 'n radio-aktiewe aminosuur word in Tabel 2 saamgevat. Die agtergrondaktiwiteit was 30 tellings per minuut. Die aktiwiteit is 24 uur nadat die toediening van die radio-aktiewe aminosure 'n aanvang geneem het, bepaal (behalwe waar anders gespesifiseer).

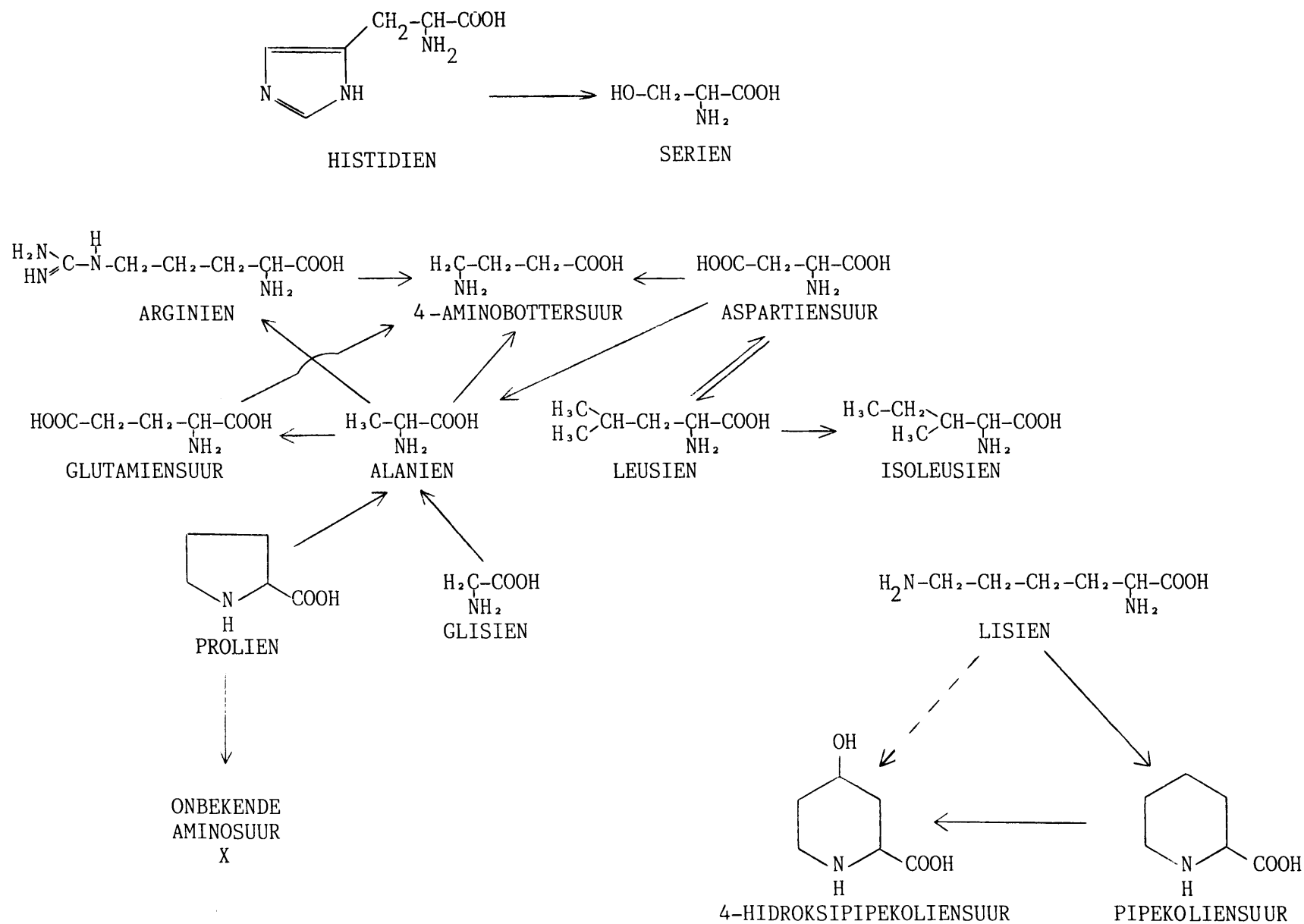
Die eksterne standaardkanaalverhouding het tussen 0,549 en 0,642 gewissel. As gevolg hiervan is die waardes wat met die vloeistofflikkerteller verkry is met 1,33 vermenigvuldig om die werklike aktiwiteit te verkry – die gekorrigeerde waardes word in Tabel 2 weergegee.

'n Samevatting van die resultate wat met die toegediende radio-aktiewe aminosure verkry is word in figuur 21 voorgestel. Die gemerkte aminosure is op 'n voorlopige wyse geïdentifiseer deur hul gedrag in 4 verskillende loopmiddels tesame met en sonder outentieke monsters van die aminosure wat dit veronderstel is om te wees chromatografies te vergelyk. X-straalplate is vir 2 weke in kontak met die papierchromatogramme gelaat. Slegs verbindings wat 'n positiewe toets met ninhidrien gegee het, is geïdentifiseer. Die gemerkte aminosure kon nie in alle gevalle geïdentifiseer word nie.

Die aktiwiteit van pipekoliensuur in die blare wat met radio-aktiewe lisien behandel is, is 2, 4 en 24 uur nadat die toediening van lisien 'n aanvang geneem het, bepaal. Die radio-aktiwiteit

Tabel 2 Die aktiwiteite in tellings per minuut (en die persentasie akkuraatheid daarvan) van die aminosure wat gemerk geraak het 24 uur na die toediening van 'n radio-aktiewe aminosuur aan die blare van Acacia mellifera in aanvang geneem het.

Radio-aktiewe aminosuur toegedien	Aminosure wat gemerk geraak het	Tellings per minuut	% Fout van t.p.m.	Getal ander radio-aktiewe stowwe
L-Alanien	Arginien	5201	3	7
	4 -Aminobottersuur	385	15	
	Glutamiensuur	363	15	
L-Arginien	Arginien	2060	7	4
	4 -Aminobottersuur	200	20	
L-Aspartiensuur	Aspartiensuur	6404	3	3
	Alanien	668	10	
	4 -Aminobottersuur	351	15	
	Leusien	325	15	
L-Glisien	Glisien	3624	5	5
	Alanien	161	20	
L-Glutamiensuur	Glutamiensuur	5355	3	4
	4 -Aminobottersuur	1028	10	
L-Histidien	Histidien	976	10	1
	Serien	95	20	
L-Lisien	Pipekoliensuur	2003	7	7
	4-Hidroksipipekoliensuur	331	15	
L-Lisien (na 4 ure)	Pipekoliensuur	972	10	2
(na 2 ure)	Pipekoliensuur	753	10	1
L-Leusien	Leusien	7944	3	1
	Isoleusien	547	10	
	Aspartiensuur	387	15	
L-Prolien	Prolien	11924	3	2
	Onbekende aminosuur x	342	15	
	Alanien	243	20	
Pipekoliensuur	Pipekoliensuur	598	10	0
	4-Hidroksipipekoliensuur	535	10	



Figuur 21 Die metabolisme van sekere aminosure wat in Acacia mellifera voorkom.

en die aantal ure nadat die toediening in aanvang geneem het, was amper reglynig (753, 972 en 2003 tellings per minuut onderskeidelik). Geen radio-aktiwiteit kon na 2 en 4 uur in 4-hidroksipipekoliensuur waargeneem word nie. Na 24 uur was die aktiwiteit daarvan egter 331 tellings per minuut. Om vas te stel of 4-hidroksipipekoliensuur biologies via pipekoliensuur of via hidroksilisien gesintetiseer word (Afdeling 3.2.1), is gemerkte pipekoliensuur uit die plant geïsoleer en aan die blare toegedien.  $^{14}\text{C}$ -gemerkte 4-hidroksipipekoliensuur kon na 4 en 24 uur waargeneem word. Dus word 4-hidroksipipekoliensuur in A. mellifera skynbaar uit pipekoliensuur eerder as uit hidroksilisien gebiosintetiseer. Dit is egter moontlik dat lisien ook deur A. mellifera gehidroksileer kan word en dat die hidroksilisien dan deur die plant gebruik kan word om 4-hidroksipipekoliensuur te vorm.

Dit is interessant dat in die gevalle waarin  $^{14}\text{C}$ -gemerkte L-alanien of L-lisien aan die blare voorsien is, hierdie aminosure na 24 uur nie meer in die  $^{14}\text{C}$ -gemerkte vorm in die blare aangetoon kon word nie, alhoewel hulle wel na 2 uur en 4 uur in die gemerkte vorm in die blare aangetoon kon word. Geen gemerkte alanien is in die blare wat met radio-aktiewe arginien behandel is, gevind nie.

Dit blyk verder uit die resultate dat 4-aminobottersuur uit alanien, arginien, aspartiensuur en glutamiensuur gebiosintetiseer kan word.

Ongeveer dieselfde hoeveelheid aspartiensuur is uit leusien as leusien uit aspartiensuur gevorm.

6 BESPREKING

6.1 Die nie-proteïenaminosure in die genus Acacia

Verskeie van die nie-proteïenaminosure van A. mellifera subsp. detinens is tot 'n relatiewe klein groep plantsoorte beperk. Sekere nie-proteïenaminosure soos byvoorbeeld pipekoliensuur kom egter in 'n wye verskeidenheid spesies voor. Heelwat navorsing word oor die allelopatiese eienskappe van dié aminosure gedoen (Fowden et al. 1979). Die rol van die aminosure in die kompetisie tussen plant en plant, en plant en dier word ondersoek. Die meganisme waarvolgens die allelopatiese aminosure deur die plant wat dit vervaardig afgebreek word, word ook nog ondersoek. Die meganisme behels waarskynlik ensimatiese reaksies.

Die nie-proteïenaminosure kom dikwels in hoë konsentrasies in plante voor. Dit is slegs in uitsonderlike gevalle dat sekondêre produkte in hoë konsentrasies in plante voorkom. Sekondêre produkte waarvan die funksies onbekend is, kan nie as nuttelose verbindings afgemaak word nie.

Toksiese sekondêre produkte verleen nie totale beskerming aan die plant wat dit vorm nie. Sekere sade kan giftig vir sekere insekte wees, terwyl die larwes van ander insekte weer daarop leef. Behalwe die rol wat dit as 'n toksiese verbinding kan speel, dien nie-proteïenaminosure ook as bergingstof vir stikstof.

Dit is moontlik dat die aminosure ook ander, tans onbekende, funksies in die plant vervul. Vicia benghalensis toon geen invloed nadat 1 mmol. dm<sup>-3</sup> kanavanien (n nie-proteïenaminosuur) aan saailinge van die plant toegedien is nie, terwyl dieselfde konsentrasie kanavanien die groei van V. aphaca saailinge met 90% inhibeer. Eersgenoemde spesie biosintetiseer self kanavanien terwyl laasgenoemde spesie dit nie doen nie (Wilson & Bell 1978). Sekere nie-proteïenaminosure is toksies omdat dit in plaas van sekere proteïenaminosure in proteïene geïnkorporeer word. Die gevormde proteïene met die verkeerde aminosure kan nie die normale funksies van die betrokke proteïen vervul nie omdat veranderinge in die sekondêre en tersiêre struktuur van die molekule plaasvind. Kanavanien verplaas arginien in die proteïene van n wye reeks organismes (Rosenthal 1977). Asetidien-2-karboksielsuur word in plaas van prolien in die hemoglobien van eritrosiete geïnkorporeer (Trasko et al. 1976). Manduca sexta larwes wat op n dieet van 0,2% kanavanien gevoed is, toon anatomiese afwykings. Rosenthal & Dahlman (1975) het aangetoon dat dié aminosuur in die insek se proteïen geïnkorporeer word. Larwes van die kewer Caryedes brasiliensis wat slegs op die saad van Dioclea megacapa gevoed het, (kanavanienkonsentrasie 8 tot 12%) toon daarenteen geen anatomiese afwykings nie. Rosenthal & Dahlman<sup>(1975)</sup> kon geen teken van kanavanien in die proteïene van die kewer vind nie.

Navorsing met die toksiese nie-proteïenaminosure in die genus Acacia kan moontlik verklarings vir die bosindringingseienskappe wat party van die spesies in die genus besit, verskaf. Dit geld vir die inheemse, sowel as uitheemse spesies.

## 6.2 Papier- en dunlaagchromatografie

Omdat outentieke materiaal van meeste van die nie-proteïenaminosure nie in die handel verkrygbaar is nie, is dit moeilik om hulle met papier- en dunlaagchromatografie te identifiseer. Die aminosure wat slegs met behulp van papier- en dunlaagchromatografie en die ninhidrienkleurreaksie geïdentifiseer is, se identiteit kan gevolglik bevraagteken word. Dit is dikwels moeilik om na aanleiding van die resultate wat met die chromatogramme verkry is, te besluit of die outentieke en ongeïdentifiseerde aminosuur dieselfde aminosuur is. Slegs die aminosure waarvan die R<sub>f</sub>-waardes en die kleurreaksie met ninhidrien duidelik met die outentieke materiaal ooreenstem, is in Figure 7 tot 9 geïdentifiseer.

Dit is moeilik om te verklaar waarom 'n groter verskeidenheid aminosure in die sade en bloeiwyses as in die blare van A. mellifera subsp. detinens voorkom. Nieman (1972) het aangetoon dat aminosure in 'n opwaartse en afwaartse rigting in plante vervoer word. 'n Hoër konsentrasie aminosure word vanaf die blare na jong sade, vrugte en blomme as na ouer sade, vrugte en blomme vervoer. Sy het ook aangetoon dat jong sade, vrugte en blomme die grootste ontvangers van aminosure vanaf die blare is.

Geen pipekoliensuur kom in die sade van Acacia mellifera subsp. detinens voor nie (Figuur 9). Dit word in die literatuur deur Evans et al. (1977) en Evans & Bell (1979) bevestig. Die pipekoliensuurkon-



sentrasie in die blare en bloeiwyses van die plant is egter relatief hoog (Figure 7 & 8). Nieman (1972) het gevind dat lisien in sekere spesies (byvoorbeeld Datura sp.) in groot hoeveelhede na die blomme vervoer word, terwyl min na die sade vervoer is. Daar is reeds voorheen gemeld (paragraaf 3.2.1) dat pipekoliensuur uit lisien gebiosintetiseer kan word. Dit is moontlik dat dieselfde toestand in A. mellifera heers en dus kan dit verklaar waarom pipekoliensuur nie in die sade van die spesie voorkom nie. Lisien is egter wel in die sade van die plant gevind. Dit is moontlik dat lisien in A. mellifera wel na die sade vervoer word, maar dat een van die ensieme wat vir die omskakeling van lisien na pipekoliensuur verantwoordelik is, nie in die sade van die spesie voorkom nie.

4-Hidroksipipekoliensuur kom egter wel in die sade van die plant voor. Daar is in afdeling 5.6 aangetoon dat 4-hidroksipipekoliensuur uit pipekoliensuur in die blare van A. mellifera gebiosintetiseer kan word. Dieselfde biosintetiese weg sal waarskynlik in die sade van die plant gevolg word. Dit is egter ook moontlik dat 4-hidroksipipekoliensuur uit 5-hidroksilisien gebiosintetiseer kan word. Pipekoliensuur word moontlik vanuit die blare na die sade vervoer maar so vinnig in die sade gemetaboliseer dat dit nie op papier- en dunlaagchromatogramme waarneembaar is nie.

### 6.3 Skeiding van die aminosure met Dowex 50 en Sephadex

Daar word aanbeveel dat ander navorsers die ioonuitruilingshars Dowex 1 gebruik om die katione in die plantekstrak van die aminosure te skei. Indien daar nie preparatief gewerk word nie, is hoëdrukvloei-stofchromatografie 'n metode wat oorweging behoort te geniet. Dié metode kan aangewend word nadat daar gepoog is om die aminosure deur middel van Dowex 50 van mekaar te skei.

Sephadex is effektief indien "ongewensde" makromolekule of anorganiese soutione in die aminosuuroplossing teenwoordig is. Die verskillende aminosure word egter bykans gladnie van mekaar deur Sephadex geskei nie omdat hul molekulêre groottes ongeveer dieselfde is. 'n Ultraviolet-monitor is handig in dié opsig dat organiese verbindings wat nie met ninhidrien reageer nie, ook in die aminosuuroplossing opgespoor kan word.

### 6.4 Identifisering van sekere aminosure

Uit die massaspektrums van geïsoleerde en outentieke pipekoliensuur (Figure 17 en 18) kan die volgende afleidings gemaak word:

- a. Die massa-ioonpiek kom vir beide pipekoliensuurmonsters teen 'n baie lae intensiteit by 129 m/e voor.
- b. Die geïsoleerde aminosuur se massaspektrum vertoon 'n piek met intensiteit 23,10% by 112 m/e - dit verteenwoordig 'n massaverlies van 17 wat waarskynlik aan die verlies van die hidroksielgroep van die karboksielsuurgroep toegeskryf kan word.

- c. Die basispiek by 84 m/e verteenwoordig 'n massaverlies van 45. Die massaverlies kan waarskynlik aan die verlies van die karboksiel-suurgroep toegeskryf word.
- d. Die piek by 56 m/e verteenwoordig waarskynlik die oopketting  $C_4H_8$  nadat ringsplitsing plaasgevind het.

Die volgende afleidings kan uit die massaspektrum van 4-hidroksipipekoliensuur (Figuur 20) gemaak word:

- a. Die massa-ioonpiek is by 145 m/e en het 'n baie lae intensiteit van 1,21%.
- b. Die basispiek is by 100 m/e en verteenwoordig 'n massaverlies van 45 wat waarskynlik aan die verlies van die karboksielsuurgroep toegeskryf kan word.
- c. Die verdere massaverlies van 18 na 82 m/e verteenwoordig waarskynlik die verlies van die hidroksielgroep en 'n waterstofioon.
- d. Die piek by 56 m/e verteenwoordig waarskynlik die oopketting  $C_4H_8$  wat gevorm is nadat ringsplitsing plaasgevind het.

Die triplet wat in die kernmagnetiese resonansiespektrum van 4-hidroksipipekoliensuur (Figuur 19C) by  $\delta 4$  voorkom, is afkomstig van die natriumsout van 3-(trimetielsiliel)-propio-1-sulfoonsuur wat in die oplosmiddel voorkom.

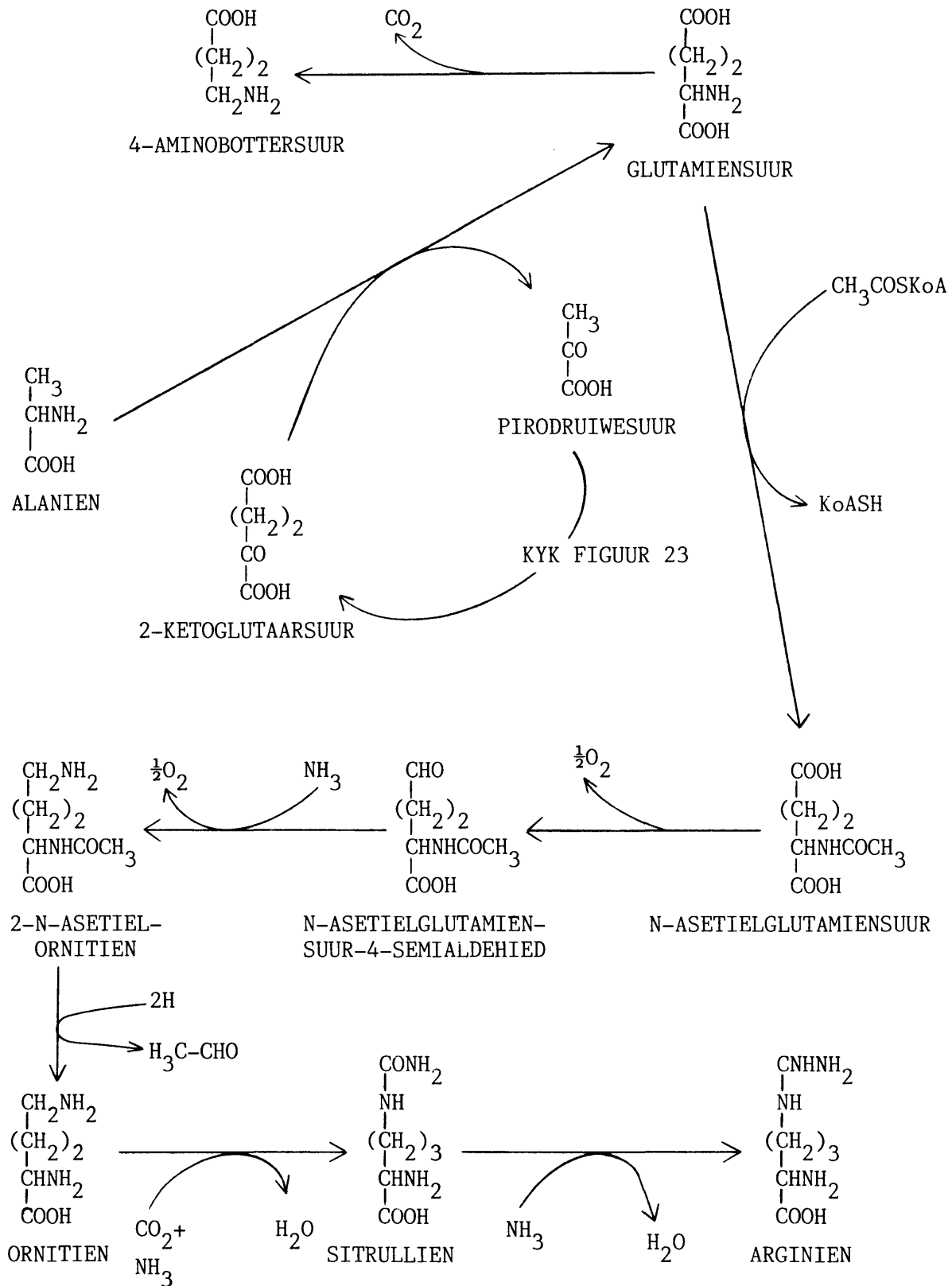
5-Hidroksipipekoliensuur is uit die blare van Acacia mellifera geïsoleer. Die aminosuur is met behulp van papier- en dunlaagchromatografie en die isatien- en ninhidrienkleurreaksies geïdentifiseer deur dit met outentieke materiaal te vergelyk. Die materiaal wat geïsoleer is, was te min vir blootstelling aan ander analitiese tegnieke.

Daar is tydens die opskryf van die verhandeling nog gepoog om die onbekende aminosuur x te isoleer en te identifiseer. Volgens die kernmagnetiese resonansiespektrum van die gesuiwerde aminosuur wil dit voorkom asof dit redelik suiwer is. Afgesien van die metodes wat reeds bespreek is, is daar ook van omgekeerde fase silikajelchromatografie gebruik gemaak vir die suiwering van dié aminosuur. Volgens die beskikbare data in die literatuur wil dit voorkom asof die aminosuur nie 'n algemeen bekende aminosuur is nie. Die grootste gedeelte van die literatuur in verband met nie-proteïenaminosure handel oor die aminosure wat in die sade van plante voorkom. Die onbekende aminosuur kon nie met behulp van papier- of dunlaagchromatografie en die ninhidrienkleurreaksie in die sade van Acacia mellifera opgespoor word nie. Dit is moontlik die rede waarom daar nie data in die literatuur oor die aminosuur opgespoor kon word nie.

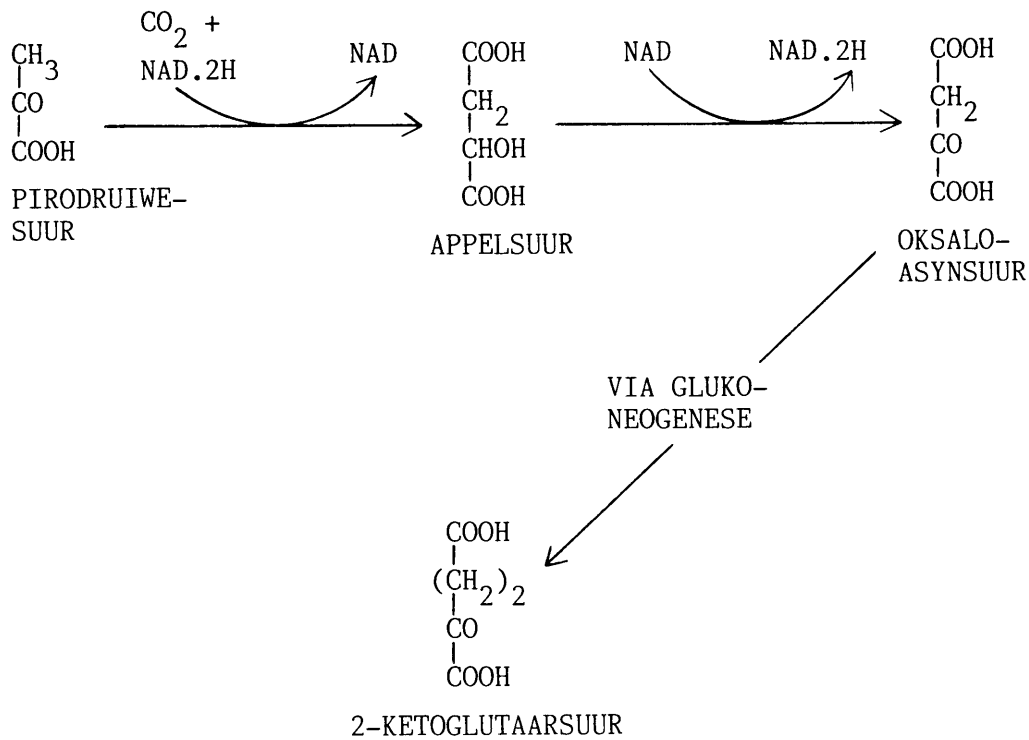
## 6.5 Die biosintese van sekere van die aminosure

Ongeveer 24 uur na die toediening van  $^{14}\text{C}$ -gemerkte alanien aan die blare van A. mellifera subsp detinens kon, behalwe vir alanien, sewe ander radio-aktiewe stowwe in die blare waargeneem word (Tabel 2). Dit dui daarop dat alanien teen 'n hoë tempo deur die blare gemetaboliseer word. In die omsettings was arginien die hoofproduk terwyl glutamiensuur en 4-aminobottersuur ook in noemenswaardige konsentrasies voorgekom het. Laasgenoemde twee verbindings se konsentrasies was ongeveer dieselfde. Die ander vier radio-aktiewe stowwe wat op die chromatogramme waargeneem is het nie sigbaar met ninhidrien gereageer nie. Hulle was dus óf nie aminosure nie, óf aminosure met 'n hoë spesifieke radio-aktiwiteit wat in sulke lae konsentrasies voorgekom het dat hulle oënskynlik nie met ninhidrien gereageer het nie.

In Figuur 22 word 'n moontlike roete vir die metaboliese omsetting van alanien na arginien, glutamiensuur en 4-aminobottersuur voorsien (McElroy & Glass 1955; Meister 1965). Volgens dié roete sal radio-aktiewe alanien aan  $^{14}\text{C}$ -gemerkte glutamiensuur oorsprong gee indien pirodruiwesuur na 2-ketoglutaarsuur omvorm kan word. 'n Roete vir die omskakeling van pirodruiwesuur na 2-ketoglutaarsuur word in Figuur 23 skematies voorgestel. Volgens Figure 22 en 23 sou 'n mens kon verwag om naas alanien, arginien, glutamiensuur en 4-aminobottersuur nog 11 ander radio-aktiewe kolle (dit sluit isoen sitroensuur wat as tussenprodukte in glukoneogenese optree in) op die chromatogramme waar te neem waarvan party soos die ketosure pirodruiwesuur, oksaloasynsuur en 2-ketoglutaarsuur nie met



Figuur 22 Die metabolisme van alanien soos dit moontlik in *Acacia mellifera* plaasvind (McElroy & Glass 1955; Meister 1965).



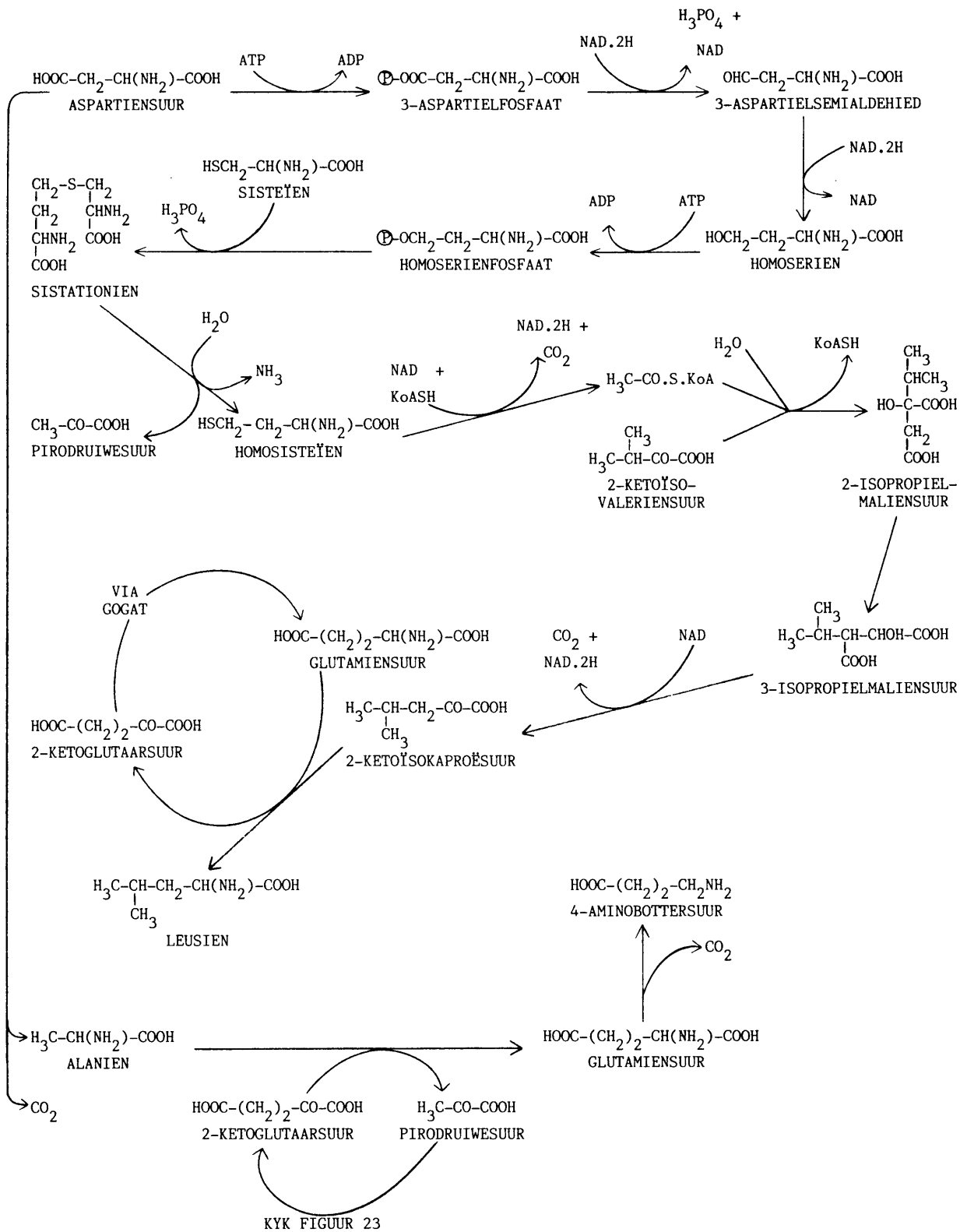
Figuur 23 Die omskakeling van pirodruiwesuur na 2-ketoglutaarsuur via glukoneogenese (Goodwin & Mercer 1983).

ninhidrien sal reageer nie terwyl ander soos N-asetielglutamien-  
 suur moontlik swak met ninhidrien sal reageer. Ornitien en sitrul-  
 lien daarenteen behoort egter goed met ninhidrien te reageer as  
 hulle in gangbare konsentrasies aanwesig is. Die resultate wat  
 met die blare van A. mellifera verkry is, is dus met die skemas  
 in Figure 22 en 23 versoenbaar. Aan die anderkant, (kyk later)  
 dien daar hier vermeld te word dat toe blare van <sup>14</sup>C-gemerkte

glutamiensuur voorsien is, radio-aktiewe arginien skynbaar nie gevorm is nie (Tabel 2). Die skynbare teenstrydige resultate dui dus waarskynlik daarop dat die omsetting van alanien na arginien nie soos in Figure 22 en 23 via glutamiensuur plaasvind nie. As dit die geval is, sou die biosintese van 4-aminobottersuur uit alanien via glutamiensuur egter nog goed by die verkreeë resultate inpas. Fowden & Webb (1958) het aangetoon dat glutamiensuur en 4-aminobottersuur in Arachis hypogaea uit alanien gevorm word. Eloff het in 1980 gevind dat glutamiensuur en 4-aminobottersuur ook in Dichapetalum cymosum uit alanien gebiosintetiseer word.

Relatief klein hoeveelhede leusien, alanien en 4-aminobottersuur is uit aspartiensuur gevorm. Dié omsettings vind moontlik volgens die roetes wat in Figuur 24 skematies voorgestel word plaas (Meister 1965; Goodwin & Mercer 1983). Slegs drie radio-aktiewe verbindings wat nie met ninhidrien waarneembaar gereageer het nie, is op radio-outogramme waargeneem nadat radio-aktiewe aspartiensuur aan die blare van die plant toegedien is. Indien die roetes gevolg word soos in die figuur voorgestel word, moet die gebrek aan 'n groot verskeidenheid radio-aktiewe tussenprodukte op die chromatogramme aan 'n te lae konsentrasie van dié stowwe of 'n te lae spesifieke aktiwiteit van die stowwe in die plant toegeskryf word. Die vorming van leusien uit aspartiensuur kan volgens die voorgestelde roete (Figuur 24) slegs plaasvind indien 2-ketoglutaarsuur na glutamiensuur omvorm kan word. Dit is bekend dat twee molekule glutamiensuur uit die reaksie tussen 2-ketoglutaarsuur en glutamien via





Figuur 24 Die moontlike metabolisme van aspartiensuur in *Acacia mellifera* subsp. *detinens* (Meister 1965; Goodwin & Mercer 1983).

die GOGAT-weg gevorm kan word (Goodwin en Mercer 1983). Die omskakeling van pirodruiwesuur na 2-ketoglutaarsuur kan soos dit in Figuur 23 voorgestel word, geskied.

'n Ondersteuning vir die voorgestelde biosintetiese weg (Figuur 24) vir die vorming van 4-aminobottersuur uit aspartienuur via alanien en glutamienuur is dat daar in ander voereksperimente tydens die huidige studie aangetoon is dat die omskakeling van (i) aspartienuur na alanien, (ii) alanien na glutamienuur en (iii) glutamienuur na 4-aminobottersuur in die plant plaasvind (Tabel 2). Dit wil dus voorkom asof die roetes soos voorgestel in Figuur 24 wel in A. mellifera gevolg word in die metabolisme van aspartienuur na alanien, glutamienuur en 4-aminobottersuur.

Ongeveer 24 uur nadat die toediening van aspartienuur 'n aanvang geneem het, was die aktiwiteit daarvan steeds baie hoog (6 404 tellings per minuut). Die metabolisme van aspartienuur in die blare van A. mellifera vind dus teen 'n lae tempo plaas. Die metabolisme van leusien en prolien vind egter teen 'n nog laer tempo plaas (Tabel 2).

Redelik baie 4-aminobottersuur (1 028 tellings per minuut) het in 24 uur uit glutamienuur ontstaan. Dit kon die gevolg van die dekarboksilering van glutamienuur wees (Figuur 14). Nadat <sup>14</sup>C-gemerkte glutamienuur aan die blare van die plant toegedien is het behalwe 4-aminobottersuur, ook twee ongeïdentifiseerde aminosure en twee verbindings wat nie waarneembaar met ninhidrien reageer

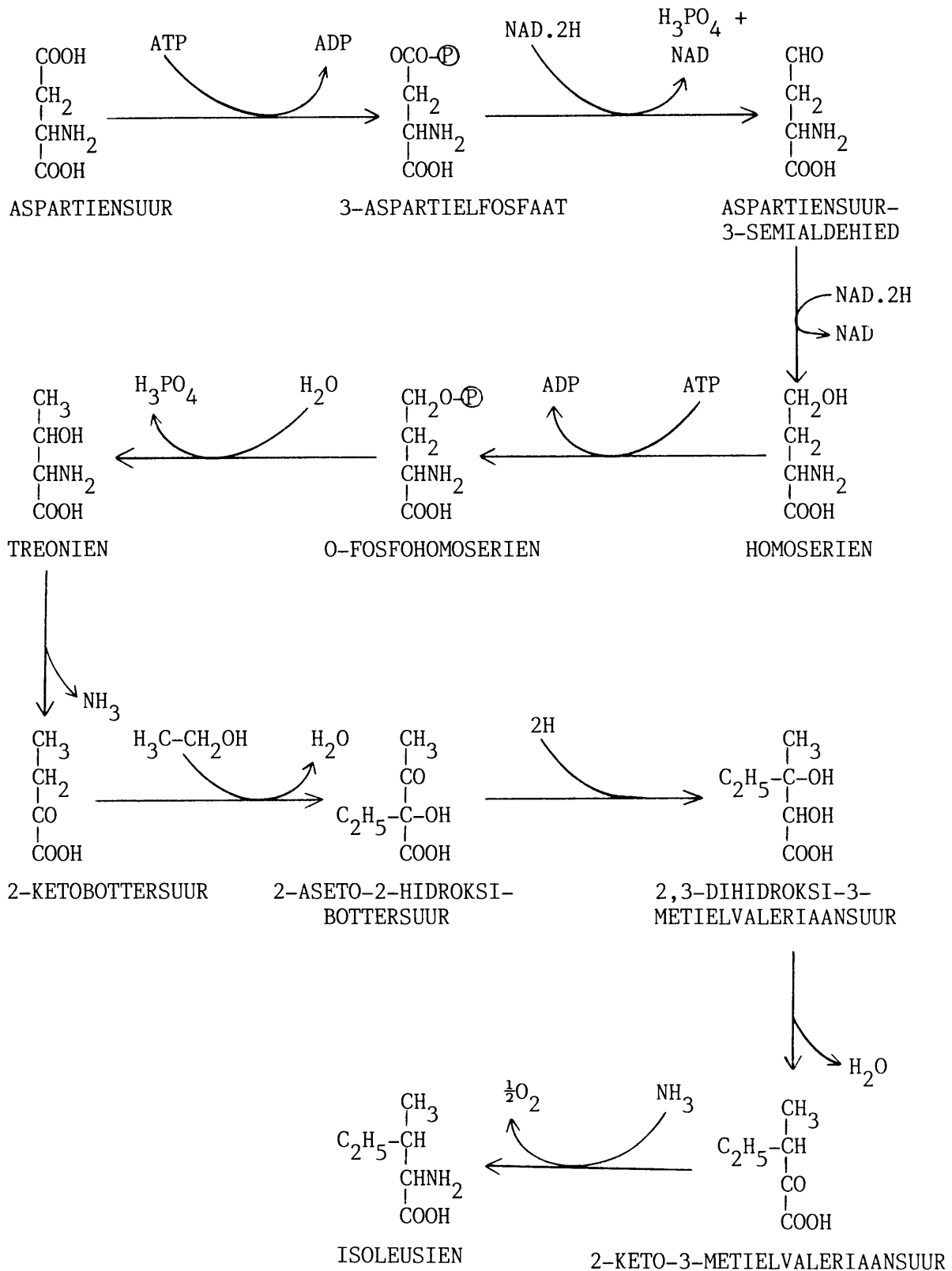
nie, radio-aktief geraak. Dit is moontlik dat laasgenoemde twee stowwe as tussenprodukte in die biosintese van die ongeïdentifiseerde aminosure optree. Die hipotese dat 4-aminobottersuur deur dekarboksilering van glutamiensuur gevorm word, kan dus korrek wees. 4-Aminobottersuur is in ander voereksperimente tydens die huidige studie ook uit aspartiensuur, alanien en arginien gevorm (Tabel 2). 4-Aminobottersuur word ook in Pseudomonas fluorescens uit glutamiensuur gevorm (Meister 1965).

Die onbekende aminosuur x het uit prolien ontstaan. Dit reageer met isatien en gevolglik is dit moontlik, soos prolien, ook 'n iminosuur. Die onbekende aminosuur x is uit geen van die ander agt toegediende proteïenaminosure gebiosintetiseer nie.

<sup>14</sup>C-gemerkte leusien het aan isoleusien, aspartiensuur en 'n skynbaar ninhidrien-onreaktiewe verbinding oorsprong gegee. Volgens die literatuur is daar twee metaboliese roetes waarvolgens leusien na isoleusien omgesit kan word:

#### Roete A:

Leusien moet eers via die omgekeerde van 'n gedeelte van die roete wat in Figuur 24 uitgebeeld word, na aspartiensuur omgesit word. Die aspartiensuur kan dan volgens die roete wat in Figuur 25 voorsien word na isoleusien omgesit word (Mc Elroy & Glass 1955; Nieman 1972; Goodwin & Mercer 1983). Hierdie besonder lang roete het die voordeel dat dit ook vir die vorming van aspartiensuur voorsiening maak. As dit die roete is wat deur A. mellifera gevolg word, is dit egter vreemd dat van die groot getal intermediêre



Figuur 25 Die biosintese van isoleusien soos dit moontlik in *Acacia mellifera* plaasvind (McElroy & Glass 1958; Nieman 1972; Goodwin & Mercer 1983).

verbindings anders as aspartiensuur, daar tydens die huidige studie aanduidings van net een van hulle waargeneem is. Dit dui dus daarop dat hierdie roete waarskynlik nie deur A. mellifera subsp. detinens gevolg word nie.

#### Roete B:

Volgens hierdie roete (Figuur 26) word leusien in 'n eenstap transaminasie-reaksie direk na isoleusien omgesit (Meister 1965). Vanweë die meganisme van transaminasie-reaksies, sal die verkreeë isoleusien egter nie radio-aktief wees as daar met  $^{14}\text{C}$ -gemarkte leusien begin is nie - tensy die 2-ketoïsokaproësuur wat ook gevorm word, op een of ander wyse geredelik na 2-keto-3-metielvaleriaansuur omvorm kan word nie. So 'n metaboliese omsetting is skynbaar nog nie in die literatuur gedokumenteer nie.

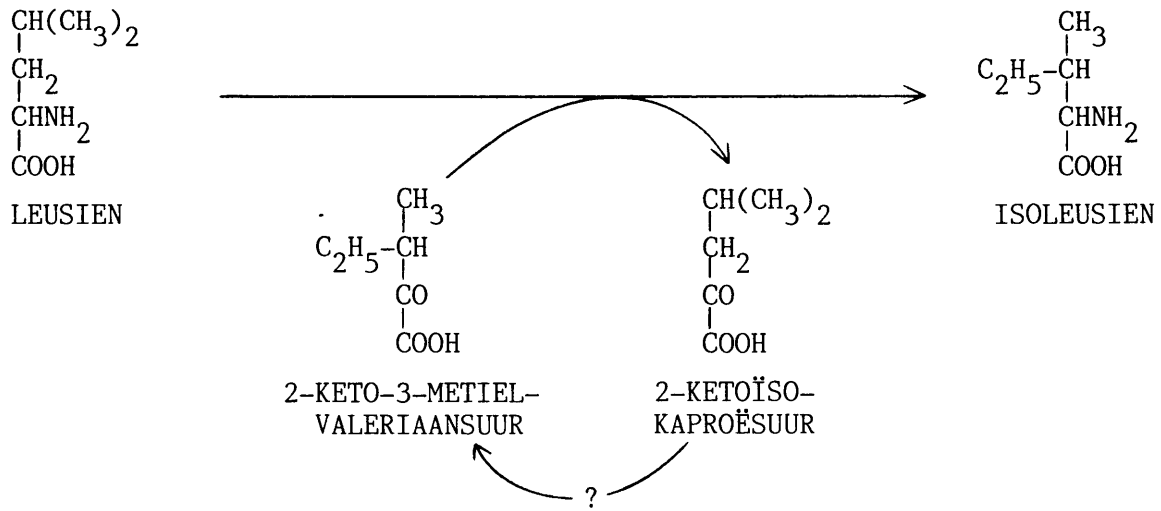
'n Verdere swakheid van hierdie andersins aantreklike roete, is dat dit nie vir die vorming van aspartiensuur uit leusien voorsiening maak nie. Hiervoor sal 'n mens, uit die beskikbare literatuur, skynbaar weer op die omgekeerde van 'n gedeelte van die roete wat in Figuur 24 voorgestel word moet terugval. Kortom, 'n mens sal moet postuleer dat leusien volgens een roete aan isoleusien oorsprong gee en langs 'n ander, redelike lang roete, aan aspartiensuur oorsprong gee.

Alhoewel die reaksie nie in die literatuur gedokumenteer skyn te wees nie, behoort dit waarskynlik moontlik te wees dat 'n plant,

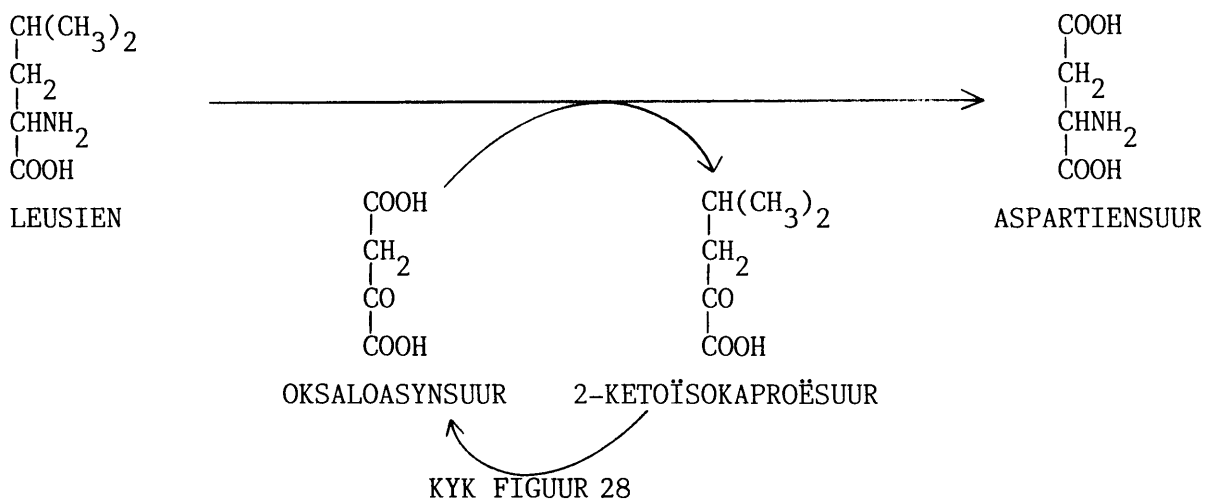
soos in Figuur 27 leusien deur middel van 'n transaminasie-reaksie direk in aspartiensuur kan omsit. Om te verseker dat die aspartiensuur radio-aktief sal wees as daar met  $^{14}\text{C}$ -gemerke leusien begin is, sal daar egter 'n meganisme gevind moet word om die 2-ketoïsookaproësuur wat ook gevorm word na oksaloasynsuur om te sit. So 'n omsetting is volgens Goodwin & Mercer (1983) vir sekere biologiese sisteme bekend (Figuur 28). Die enigste onaantreklike aspek van hierdie omsetting is weer die feit dat slegs een skynbaar ninhidrien-onreaktiewe verbinding tydens die werklike omsetting waargeneem is, terwyl agt in die omsetting betrokke is en ses daarvan deur die metodes wat gebruik is aangetoon behoort te kan word as hul spesifieke radio-aktiwiteit en/of konsentrasie hoog genoeg is.

Van al die aminosuuromsettings wat in die plant waargeneem is en vanaf weerskante ondersoek is, was die aspartiensuur-leusien-reaksie die enigste een wat in so mate omkeerbaar was dat dit met behulp van radio-outogramme en 'n vloeistofflitsteller waargeneem kon word. Die maklike omkeerbaarheid van die proses, dui daarop dat die ewewigskonstante van die omsetting as geheel na aan een is. Dit is egter natuurlik ook moontlik dat die twee omsettings deur middel van verskillende roetes plaasvind.

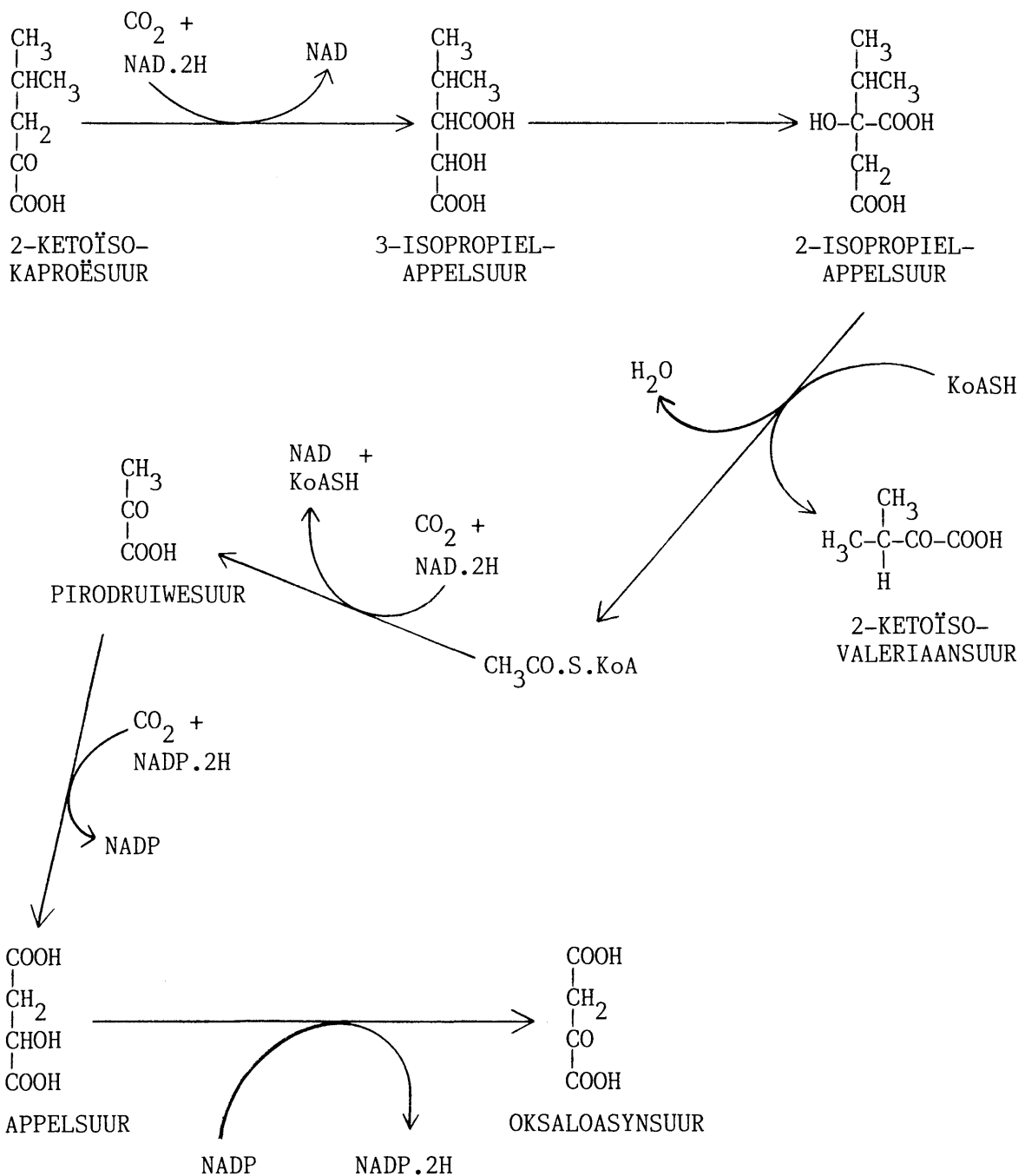
Pipekoliensuur is vanuit lisien gebiosintetiseer. Pipekoliensuur het die tweede hoogste aktiwiteit gehad van al die aminosure wat uit die toegediende  $^{14}\text{C}$ -gemerkte aminosure gebiosintetiseer is.



Figuur 26 Die moontlike weg vir die vorming van isoleusien uit leusien in Acacia mellifera (Meister 1965).



Figuur 27 Die vorming van aspartiensuur uit leusien soos dit moontlik in A. mellifera plaasvind.



Figuur 28 Die omskakeling van 2-ketoïsokaproësuur na oksaloasynsuur (Goodwin & Mercer 1983).



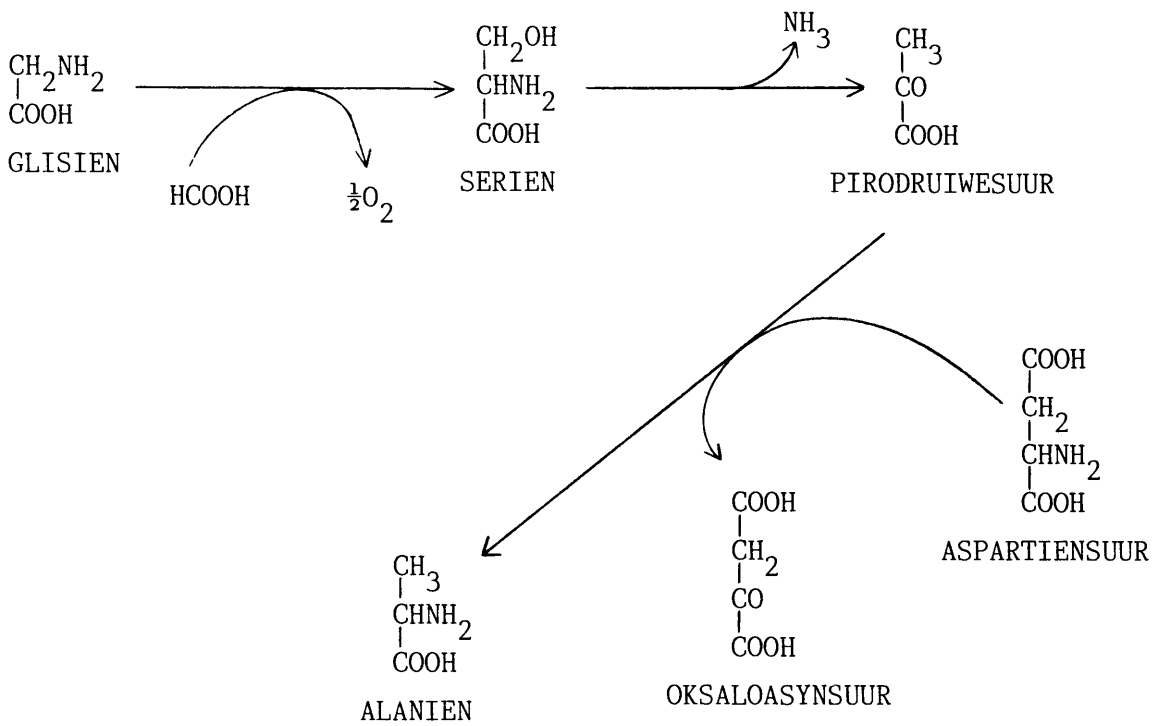
Slegs arginien wat uit alanien gevorm is (Figuur 22) se aktiwiteit was hoër. Daar was 'n reglynige verband tussen die radio-aktiwiteit van die pipekoliensuur wat vanuit lisien gebiosintetiseer is en die duur van die proef. Geen radio-aktiewe 4-hidroksipipekoliensuur kon waargeneem word 2 en 4 uur nadat die toediening van  $^{14}\text{C}$ -gemarkte lisien 'n aanvang geneem het nie. Na 24 uur was die aktiwiteit van 4-hidroksipipekoliensuur egter 331 tellings per minuut. Nadat geïsoleerde radio-aktiewe pipekoliensuur aan die blare van A. mellifera toegedien is, was die aktiwiteit van 4-hidroksipipekoliensuur na 24 uur 535 tellings per minuut. Dié resultate dui daarop dat 4-hidroksipipekoliensuur via pipekoliensuur vanuit lisien gebiosintetiseer word. Dit sou interessant wees om vas te stel of A. mellifera subsp. detinens 4-hidroksipipekoliensuur direk uit 5-hidroksilisien kan sintetiseer.

In die geval waar  $^{14}\text{C}$ -gemarkte glisien aan die blare toegedien is, het dit aan radio-aktiewe alanien asook 2 ander ongeïdentifiseerde radio-aktiewe aminosure en 3 radio-aktiewe verbindings wat nie waarneembaar met ninhidrien gereageer het nie, oorsprong gegee. 'n Moontlike meganisme vir die vorming van alanien uit glisien word in Figuur 29 skematies voorgestel. Een van die ongeïdentifiseerde radio-aktiewe aminosure se  $R_f$ -waarde was ongeveer dieselfde as dié van serien. Die ander radio-aktiewe stowwe wat waargeneem is (ongeïdentifiseer) sal volgens hierdie hipotese waarskynlik almal aan newereaksies toegeskryf moet word. Nieman (1972) en Eloff (1980) het ook gevind dat alanien uit glisien in 'n wye verskeidenheid van spesies onder andere Dichapetalum cymosum gevorm word.

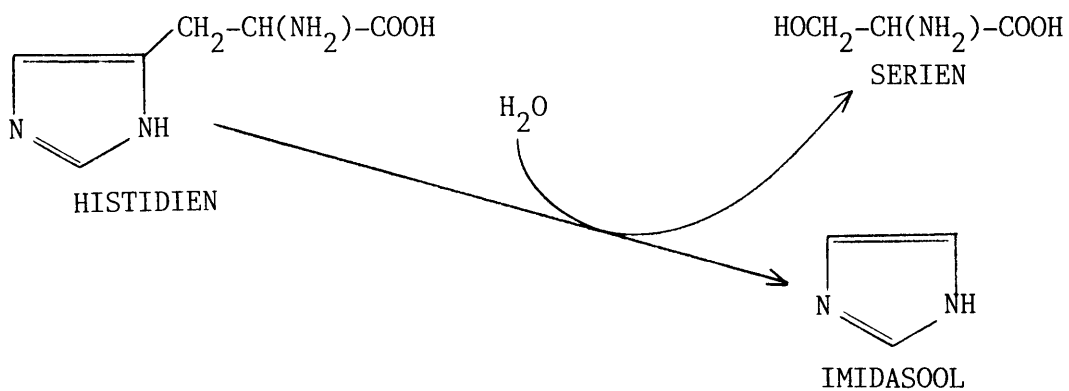
In die huidige studie is histidien slegs na serien omvorm. Dit gebeur waarskynlik deur middel van die hidrolise van die histidienmolekuul na die imidasoolring en serien (Figuur 30). Een ninhidrienonreaktiewe verbinding wat waarskynlik die imidasoolring is, is ook op die radio-outogramme waargeneem. Uit die literatuur wil dit voorkom of so 'n omsetting nog nie vroeër waargeneem is nie.

Die vorming van alanien uit prolien en 4-aminobottersuur uit arginien is skynbaar ook nie vroeër in die literatuur gedokumenteer nie. Alanien word moontlik uit prolien gevorm deur die reduktiewe breking van die pirrolidienring tussen koolstofatome 3 en 4 en tussen koolstofatoom 5 en die stikstofatoom om dan alanien en etileen te vorm (Figuur 31). Behalwe die onbekende aminosuur x het twee skynbaar ninhidrienonreaktiewe stowwe ook radio-aktief geraak nadat radio-aktiewe prolien aan die blare van die plant toegedien is. Dié verbindings kan tussenprodukte in die vorming van die onbekende aminosuur x wees of dit kan stowwe wees wat uit die verdere metabolisme van alanien ontstaan het. Hulle kan eweneens produkte van 'n ander metaboliese roete waarby prolien betrokke is, wees.

4-Aminobottersuur word moontlik via die omgekeerde van die roete wat in Figuur 22 voorgestel word, uit arginien gevorm. Behalwe 4-aminobottersuur het vier ander skynbaar ninhidrienonreaktiewe stowwe radio-aktief geraak nadat  $^{14}\text{C}$ -gemarkte arginien aan die

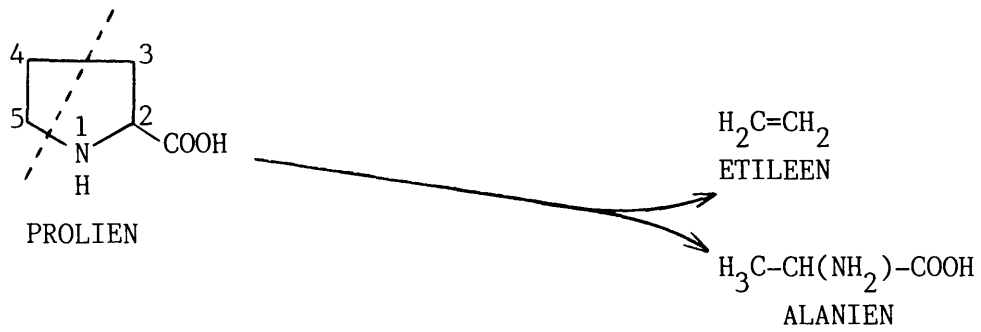


Figuur 29 Die vorming van alanien uit glisien soos dit moontlik in Acacia mellifera plaasvind.



Figuur 30 Die vorming van serien uit histidien soos dit moontlik in Acacia mellifera plaasvind.

blare van die plant toegedien is. Dit is dus moontlik dat die omskakeling van arginien na 4-aminobottersuur via 'n aantal tussenprodukte geskied.



Figuur 31 Die vorming van alanien uit prolien soos dit moontlik in Acacia mellifera subsp. detinens plaasvind.

7 SAMEVATTING

Die literatuuroorsig behels 'n bespreking van (a) die teorie van sekere isolerings- en analitiese metodes, (b) die rol van toksiese aminosure in die genus Acacia en (c) die biosintese van sekere nie-proteïenamino-sure wat in die genus voorkom.

Al die vrye aminosure wat in die blare van Acacia mellifera subsp. detinens voorkom, is bestand teen oksidering met 15% (v/v) waterstofperoksied by kamer-temperatuur, suurhidrolise met 3 mol. dm<sup>-3</sup> soutsuur by 100°C en alkaliese hidrolise met 5% (m/v) bariumhidroksied by 100°C.

Die vrye aminosure wat in die blare, blomme en sade van die plant voorkom, is vergelyk. 'n Groter verskeidenheid vrye aminosure kom in die bloeiwyses en sade as in die blare van die plant voor.

'n Goeie skeiding van die vrye aminosure van die blare is met 'n ammoniumformiaatbuffer in 'n Dowex 50 ionuitruilingsharskolom verkry. Sephadexkolomme is vir die verdere suiwing van die aminosure gebruik.

Alanien, pipekoliensuur en 4-hidroksipipekoliensuur is in suiwer kristallyne vorm geïsoleer. Die identiteit van die geïsoleerde aminosure is deur middel van massaspektroskopie, kernmagnetiese resonansie-

spektroskopie en in die geval van alanien ook met outomatiese amino-suuranalise ondubbelsinnig bevestig. Aspartiensuur, 2-amino-3-asetielaminopropionsuur, 4-aminobottersuur, 2-amino-3-ureïdopropionsuur, glisien, glutamiensuur, 5-hidroksipipekoliensuur, lisien, serien en valien is met behulp van papier- en dunlaagchromatografie in vier verskillende loopmiddelsisteme en die ninhidrienkleurreaksie voorlopig geïdentifiseer. Die biosintese van sekere aminosure is met behulp van  $^{14}\text{C}$ -gemarkte uitgangstowwe ondersoek. Daar is vasgestel dat pipekoliensuur biologies uit lisien gesintetiseer word. 4-Hidroksipipekoliensuur word dan deur die hidroksilering van die pipekoliensuur deur die plant gevorm.

8 SUMMARY

The literature synopsis consists of a discussion of (a) the theory of some isolation and analytical methods, (b) the role of toxic amino acids which occur in the genus Acacia and (c) the biosynthesis of some of the non-protein amino acids in the genus.

The free amino acids which occur in the leaves of Acacia mellifera subsp. detinens are not affected by oxidation, with 15% (v/v) hydrogen peroxide at room temperature, hydrolysis with 3 mol. dm<sup>-3</sup> hydrochloric acid at 100°C and hydrolysis with 5% (m/v) barium hydroxide at 100°C.

The free amino acids that occur in the leaves, flowers and seeds of the plant were compared. A larger variety of amino acids occurs in the flowers and seeds of the plant than in its leaves.

A good separation of the free amino acids of the leaves was obtained with an ammonium formate buffer in a Dowex 50 ion exchange resin column. Sephadex columns were used for further purification of the amino acids.

Alanine, pipercolic acid and 4-hydroxypipercolic acid were isolated in pure crystalline form from the leaves of the plant. Their chemical structures were confirmed by mass spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy, and in the case of alanine also with automatic amino acid analysis. Aspartic acid, 2-amino-3-acetylaminopropionic

acid, 4-aminobutyric acid, 2-amino-3-ureidopropionic acid, glycine, glutamic acid, 5-hydroxypipelicolic acid, lysine, serine and valine were identified by paper and thin layer chromatography only. The biosynthesis of some of the amino acids were examined by means of  $^{14}\text{C}$ -labelled precursors. Pipelicolic acid is biosynthesized from lysine. 4-Hydroxypipelicolic acid is derived from pipelicolic acid by hydroxylation.



DANKBETUIGINGS

Opregte dank word aan alle persone en instansies wat dit moontlik gemaak het om hierdie studie te voltooi, betuig. 'n Spesiale woord van dank gaan aan die volgende persone en instansies:

- Die Universiteit van Pretoria vir die beskikbaarstelling van fasiliteite.
- Prof. dr. N. Grobbelaar onder wie se leiding hierdie studie onderneem is. Sy belangstelling en leiding was van groot hulp in die uitvoering van die studie.
- Die Nasionale Instituut vir Plantbeskerming vir die geleentheid om voltyds aan die Universiteit van Pretoria te studeer.
- Dr. P. S. Steyn en dr. C. P. Gorst-Allman van die Nasionale Chemiese Navorsingslaboratorium by die WNNR vir hulp met die isolering en identifisering van sekere van die aminosure.
- Mnr. P. R. de Beer van die Nasionale Instituut vir Plantbeskerming vir sy hulp met die massaspektrometriese analises.
- Mnr. E. R. Palmer van die Departement Chemie aan die Universiteit van Pretoria vir sy hulp met die verkryging van kernmagnetiese resonansiespektrums van die geïsoleerde aminosure.
- Mnr. Z. Apostolides van die Departement Biochemie aan die Universiteit van Pretoria vir die bepaling van die aktiwiteit van die radio-aktiewe aminosure.
- Mej. M. Cross, mnr. W. Hattingh en mnr. A. M. Wassenaar vir tegniese hulp.
- Mev. C. H. van Coller en mev. S. S. Jonker vir die tikwerk.
- Mnr. M.W. Bredenkamp van die Departement Chemie vir hulp met van die organiese chemie in die verhandeling.

10 LEWENSSKETS

Jacobus Johannes Marion Meyer is op 20 Maart 1958 te Pretoria gebore. Hy het sy laerskoolopleiding aan die Laerskool Louis Leipoldt te Verwoerdburg deurloop en het in 1975 aan die Hoërskool Menlopark gematrikuleer. Hy het in 1976 vir die B.Sc-graad aan die Universiteit van Pretoria ingeskryf en die graad in 1979 met Plantkunde en Chemie as hoofvakke verwerf.

Aan die einde van 1980 het hy die B.Sc (Hons.)-graad met Plantfisiologie as hoofrigting en Plantekologie as newerigting aan die Universiteit van Pretoria behaal. Hy was gedurende 1980 as tydelike-deeltydse junior dosent by die Departement Plantkunde aan die Universiteit van Pretoria werksaam.

Gedurende 1981 en 1982 het hy sy militêre diensplig verrig en in 1983 het hy met navorsing vir sy M.Sc-graad in Plantfisiologie aan die Universiteit van Pretoria begin.

Hy is sedert 1980 lid van die Suid-Afrikaanse Genootskap vir Plantkundiges.

11 LITERATUURLYS

- BELL, E.A. 1976. Uncommon amino acids in plants. FEBS Lett. 64(1): 29-35.
- BONNER, W.A. & CASTRO, A.J. 1967. Essentials of modern organic chemistry. Hfst. 4. Reinhold Publishing Corporation, New York, Londen, Amsterdam.
- CARR, J.D. 1976. The South African Acacias. p.243. Conservation Press. Johannesburg, Londen, Manzini.
- COHEN, L.A., IRREVERRE, F., PIEZ, K.A., WITKOP, B. & WOLF, H.L. 1956. Synthesis of 5-hydroxypipicolic acid and separation of its diastereoisomers. Science 123:842-843.
- CONSDEN, R., GORDON, A.H. & MARTIN, A.J.P. 1944. Qualitative analysis of proteins: a Partition chromatographic method using paper. Biochem. J. 38(3):224-232.
- DENT, C.E. STEPKA, W. & STEWARD, F.C. 1947. Detection of the free amino acids of plant cells by partition chromatography. Nature 160: 682-683.
- EBERSÖHN, J., ROBERTS, B.R. & VORSTER, L.F. 1960. Bosindringing in die Molopogebied van die O.V.S.-Streek. Afgerolde verslag.
- ELOFF, J.N. 1980. The amino acid metabolism of Dichapetalum cymosum (Engl.) (Gifblaar). I. The biosynthesis of N-methyl-L-alanine and N-methyl-L-serine. Z. Pflanzenphysiol. 98: 403-410.
- EVANS, C.S. & BELL, E.A. 1979. Non-protein amino acids of Acacia species and their effect on the feeding of the acridids Anacridium melanorhodon and Locusta migratoria. Phytochem. 18: 1807-1810.

- EVANS, C.S. & BELL, E.A. 1980. Neuroactive plant amino acids and amines. Trends in Neurosciences. Mrt.:70-72.
- EVANS, C.S., BELL, E.A. & JOHNSON, E.S. 1979. N-Methyltyramine a biologically active amine in Acacia seeds. Phytochem. 18:2022-2023.
- EVANS, C.S., QURESHI, M.Y. & BELL, E.A. 1977. Free amino acids in the seeds of Acacia species. Phytochem. 16:565-570.
- FOWDEN, L. & WEBB, J.A. 1958. The incorporation of <sup>14</sup>C-labelled substrates into the amino-acids of groundnut plants (Arachis hypogaea). Ann. Bot., N.S. 22(85):73-93.
- FOWDEN, L. 1960. The metabolism of labelled lysine and pipercolic acid by Acacia phyllodes. J. Exp. Bot. 11(33):302-315.
- FOWDEN, L. 1963. Amino acid analogues and the growth of seedlings. J. Exp. Bot. 14:387-398.
- FOWDEN, L. 1966. Origins of the amino acids. In: Plant Biochemistry, red. Bonner, J. & Varner, J.E. Hfst. 16. Academic Press, New York.
- FOWDEN, L., LEA, P.J. & BELL, E.A. 1979. The nonprotein amino acids of plants. Adv. Enzymol. 50:117-175.
- GOODWIN, T.W. & MERCER, E.I. 1983. Introduction to Plant Biochemistry. Pergamon Press. Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt.
- GREENSTEIN, J.P. & WINITZ, M. 1961. Chemistry of the amino acids. Vol. 2, pp. 1301-1303. John Wiley & Sons, Inc. New York, London.

- GROBBELAAR, N. & STEWARD, F.C. 1953. Pipecolic acid in Phaseolus vulgaris: Evidence on its derivation from lysine. J. Am. Chem. Soc. 75:4341-4343.
- GUPTA, R.N. & SPENCER, I.D. 1970. Biosynthesis of the piperidine nucleus: The occurrence of two pathways from lysine. Phytochem. 9:2329-2334.
- HAIS, I.M. 1963. Paper chromatography. pp. 441-451. Academic Press, New York.
- HIRS, C.H.W., MOORE, S. & STEIN, W.H. 1952. Isolation of amino acids by chromatography on ion exchange columns; use of volatile buffers. J. Biol. Chem. 195:669-683.
- JANZEN, D.H. 1971. Seed predation by animals. Ann. Rev. Ecol. Syst. 2:465-492.
- JANZEN, D.H., JUSTER, H.B. & BELL, E.A. 1977. Toxicity of secondary compounds to the seed-eating larvae of the bruchid beetle Callosobruchus macolatus. Phytochem. 16:223-227.
- KAISER, R.E. & OELRICH, E. 1981. Optimization in HPLC. Hfst. 1. Hütig, Heidelberg, Basel, New York.
- KNOX, J.H. 1979. High performance liquid chromatography. Hfst. 1. Edinburgh University Press, Edenburg.
- KRAUSS, G.J. & REINBOTHE, H. 1972. Die freien aminosäuren in samen von Mimosaceae. Phytochem. 12:125-142.
- KUO, Y.L., LAMBEIN, F., IKEGAMI, R. & VAN PARIJS, R. 1982. Isoxazolin-5-ones and amino acids in root exudates of pea and sweet pea seedlings. Plant Physiol. 70:1283-1289.
- LANDAU, A.J., FUERST, R. & AWAPARA, J. 1951. Paper chromatography of amino acids. Analyt. Chem. 23(1):162-168.

- LINDSTEDT, S. & LINDSTEDT, G. 1959. On the formation of 5-hydroxypipericolic acid from  $\gamma$ -hydroxy-DL-lysine. Arch. Biochem. Biophys. 85:565-567.
- MALATHI, K., PADMANABAN, G., RAO, S.L.N. & SARMA, P.S. 1967. Studies on the biosynthesis of  $\beta$ -N-oxalyl-L- $\alpha, \beta$ -diaminopropionic acid, the Lathyrus sativus neurotoxin. Biochim. Biophys. Acta 141:71-78.
- MARTIN, A.J.P. & SYNGE, R.L.M. 1941. A new form of chromatogram employing two liquid phases. Biochem. J. 35:1358-1368.
- McELROY, W.D. & GLASS, H.B. 1955. A symposium on amino acid metabolism. The Johns Hopkins Press, Baltimore.
- MEISTER, A., PADHAKRISHNAN, A.N. & BUCKLEY, S.D. 1957. Enzymatic synthesis of L-pipecolic acid and L-proline. J. Biol. Chem. 229:789-800.
- MEISTER, A. 1965. Biochemistry of the amino acids. Vol I. p.356. Academic Press, New York, London.
- MOLLER, B.L. 1976. Lysine catabolism in barley (Hordeum vulgare L.) Plant Physiol. 57:687-692.
- MOORE, S. & STEIN, W.H. 1951. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. J. Biol. Chem. 192:663-681.
- NAVON, A. & BERNAYS, E.A. 1978. Inhibition of feeding in acrids by non-protein amino acids. Comp. Biochem. Physiol. 59A:161-164.
- NIEMAN, E.J. 1972. A study of translocation patterns of C<sup>14</sup>-labelled amino acids and amides in selected plant species. Ph.D.-proefschrift. Universiteit van Suid-Afrika.
- PALMER, E. & PITMAN, N. 1972. Trees of Southern Africa. Vol. 2, p.751. A.A. Balkema, Kaapstad.

- REINBOTHE, H. 1962. Zur biosynthese von Albizziin in Albizzia lophantha Benth. Flora 152(s):545-554.
- ROBBERTSE, P.J. 1971. n Morfologiese studie van die genus Acacia Miller in Suid-Afrika. D.Sc-proefskrif. Universiteit van Pretoria.
- ROSENTHAL, G.A. & DAHLMAN, D.L. 1975. Non-protein amino acid - insect interactions. Comp. Biochem. Physiol. 52A:105-108.
- ROSENTHAL, G.A. 1977. The biological effects and mode of action of L-canavanine, a structural analogue of L-arginine. Q. Rev. Biol. 52:155-178.
- ROSENTHAL, G.A. 1982. Plant non-protein amino and imino acids. Biological and toxicological properties. Hfst. 1. Academic Press, New York, Londen.
- SENEVIRATNE, A.S. & FOWDEN, L. 1968a. Diamino acid metabolism in plants with special reference to 2, 3-diaminopropionic acid. Phytochem. 7:1047-1056.
- SENEVIRATNE, A.S. & FOWDEN, L. 1968b. The amino acids of the genus Acacia. Phytochem. 7:1039-1045.
- SHOOLERY, J.N. & VIRTANEN, A.I. 1963. Molecular conformation of 4- and 5-hydroxypipericolic acids. Acta Chem. Scand. 16(10): 2457-2458.
- SHRINER, R.L., FUSON, R.C. & CURTIN, D.Y. 1967. The systematic identification of organic compounds. Hfst. 9. John Wiley & Sons, Inc. New York, Londen, Sydney.
- SPACKMAN, P.H., STEIN, W.N. & MOORE, S. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Analyt. Chem. 30(7):1190-1206.

- STEWART, F.C., POLLARD, J.K., PATCHETT, A.A. & WITKOP, B. 1958. The effect of selected nitrogen compounds on the growth of plant tissue cultures. Biochim. Biophys. Acta. 28:308-317.
- THOMPSON, J.F. & MOORE, D.P. 1968. Enzymatic synthesis of cysteine and s-methylcysteine in plant extracts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31:281-286.
- TRASKO, C.S., FRANZBLAU, C. & TROXLER, R.F. 1976. Incorporation of L-azetidine-2-carboxylic acid into hemoglobins in sickle erythrocytes in vitro. Biochim. Biophys. Acta 447:425-435.
- VAN NIEKERK, J.P. 1980. Die plek en rol van chemiese bestryding van bos met ekonomiese implikasies. Handelinge en werksessie in verband met bosindringing en verdigting. Dept. Landbou, Pretoria.
- VIRTANEN, A.I. & KARI, S. 1954. 5-Hydroxy-piperidine-2-carboxylic acid in green plants. Acta Chem. Scand. 8(7):1290-1291.
- VIRTANEN, A.I. & KARI, S. 1955. 4-Hydroxy-piperidine-2-carboxylic acid in green plants. Acta Chem. Scand. 9(1):170-171.
- WILLIAMS, B.L. & WILSON, K. 1975. A biologist's guide to principles and techniques of practical biochemistry. p.76. Elsevier, New York.
- WILSON, M.F. & BELL, E.A. 1978. Amino acids and  $\alpha$ -aminopropionitrile as inhibitors of seed germination and growth. Phytochem. 17:403-406.