

- ¹⁷ S. SANO, S. INOUE, Y. TANABE, C. SUMIYA AND S. KOIKE, *Science*, 129 (1959) 275.
¹⁸ D. SHEMIN, G. KIKUCHI AND B. J. BACHMANN, *Federation Proc.*, 17 (1958) 1226.
¹⁹ K. L. GIBSON, W. G. LAVER AND A. NEUBERGER, *Federation Proc.*, 17 (1958) 899.
²⁰ W. G. LAVER, A. NEUBERGER AND S. UDENFRIEND, *Biochem. J.*, 70 (1958) 4.
²¹ K. D. GIBSON, W. G. LAVER AND A. NEUBERGER, *Biochem. J.*, 70 (1958) 71.
²² H. HEATH AND D. S. HOARE, *Biochem. J.*, 72 (1959) 14.
²³ L. BOGORAD, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 510.
²⁴ G. H. COOKSON AND C. RIMINGTON, *Biochem. J.*, 51 (1954) 476.
²⁵ A. NEUBERGER AND J. J. SCOTT, *Nature*, 172 (1953) 1093.

Biochim. Biophys. Acta, 39 (1960) 458-462

SÉPARATION ET CARACTÉRISATION DE LA N-ÉTHYL- γ -GLUTAMINE À PARTIR DE *XEROCOMUS BADIUS*

J. CASIMIR, J. JADOT ET M. RENARD

*Laboratoires de Chimie Générale et Organique, Institut Agronomique de l'Etat à Gembloux
et Université de Liège (Belgique)*

(Reçu le 5 août, 1959)

SUMMARY

Separation and identification of N-ethyl- γ -glutamine from Xerocomus badius

A derivative of glutamic acid has been found in the non protein nitrogen fraction of the mushroom *Xerocomus badius*.

The compound was isolated by paper partition chromatography and was shown to be N-ethyl- γ -glutamine.

The structure was confirmed by comparison with the synthetic compound.

Different steps involved in the possible biogenesis of N-ethyl- γ -glutamine have been discussed.

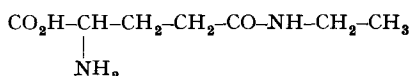
INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, le développement considérable des techniques chromatographiques sur papier et sur colonnes de résines échangeuses d'ions a permis la découverte de nombreux acides aminés nouveaux dans la fraction soluble dans l'alcool des organismes végétaux. Un grand nombre de ces substances sont des dérivés de l'acide glutamique; certains ont été découverts par VIRTANEN *et al.*: l'acide γ -hydroxyglutamique dans *Phlox decussata*¹, l'acide $\beta\gamma$ -dihydroxyglutamique dans les graines de *Lepidium sativum* et dans les parties vertes de *Rheum rhaponticum*^{2,3}, l'acide γ -méthyl glutamique et l'acide γ -méthyl- γ -hydroxyglutamique dans *Phyllitis scolopendrium*^{4,5}. Signalons la présence de l'acide γ -méthylène-glutamique et de l'amide correspondante décrite par DONE ET FOWDEN⁶ dans *Arachis hypogaea* et par ZACHARIUS, POLLARD ET STEWARD⁷ dans la tulipe. Parmi les peptides dérivés de l'acide glutamique signalons aussi la découverte de la γ -glutamylalanine et de l'acide γ -glutamyl-valyl glutamique respectivement dans le pois en germination et dans *Juncus conglomeratus*

par VIRTANEN *et al.*^{8,9} et celle de la γ -glutamyl-S-méthyl cystéine par ZACHARIUS, MORRIS ET THOMPSON¹⁰ dans *Phaseolus vulgaris*.

La présente publication décrit l'isolement et la détermination de la structure d'un acide aminé, dérivé de l'acide glutamique, à partir d'un champignon de la famille des Boletacées: *Xerocomus badius* (Fr.)^{*}.

Cette substance, la N-éthyl- γ -glutamine:



existe en quantité importante dans ce champignon. L'acide aminé naturel et la N-éthyl- γ -glutamine préparée par synthèse possèdent des propriétés physiques et chimiques identiques.

MÉTHODES ET RÉSULTATS

Techniques chromatographiques

L'analyse bidimensionnelle a été réalisée à l'aide de papier Schleicher et Schüll No. 2043b avec le choix de solvants suivants: (a) *n*-butanol-acide formique-eau (75:15:10); phénol saturé par un tampon phosphate-acide citrique à pH = 4.2¹¹. (b) *n*-butanol-acide acétique-eau (63:27:10); phénol saturé d'eau en présence d'ammoniac¹².

La chromatoelectrorhéophorèse sur papier a été effectuée avec le solvant *n*-butanol-acide formique dans le sens de la chromatographie et avec une solution d'acide acétique *N* dans la direction de l'électrophorèse¹³.

Les acides aminés ont été révélés à l'aide d'une solution de ninhydrine 0.25 % dans l'éthanol 95 %.

Le papier Whatman No. 3 a été utilisé pour la préparation chromatographique de la substance.

L'étude de la distribution des acides aminés libres dans la fraction soluble dans l'éthanol 80 % des bolets, nous a permis de mettre en évidence sur les chromatogrammes A et B de *Xerocomus badius* une tache nouvelle; cette tache de coloration violette intense avec la ninhydrine se trouve à proximité du front du phénol et au dessus de la valine. Un spot correspondant se retrouve à la chromatoelectrorhéophorèse à gauche de l'alanine et en dessous de l'acide glutamique et de la thréonine (spot M des Figs. 1 et 2).

Le Tableau I indique les valeurs des R_F de la tache nouvelle pour les différents solvants utilisés.

Ces propriétés chromatographiques et la sensibilité particulière de la substance à l'hydrolyse par les acides et les bases même dilués nous ont permis de considérer le composé M comme un constituant peu commun des organismes végétaux et de mettre au point une technique d'isolement^{**}.

Isolement de la substance

Les carpophores frais (2,140 kg) ont été pulvérisés dans un Waring blender en présence de 8.5 l d'éthanol 95 %, de façon à obtenir une concentration approximative

^{*} L'identification des récoltes est due au Dr. P. HEINEMANN à qui nous adressons nos sincères remerciements.

^{**} Il se peut qu'il soit identique à la "théanine" isolée des feuilles de thé par Y. SAKATO²³.

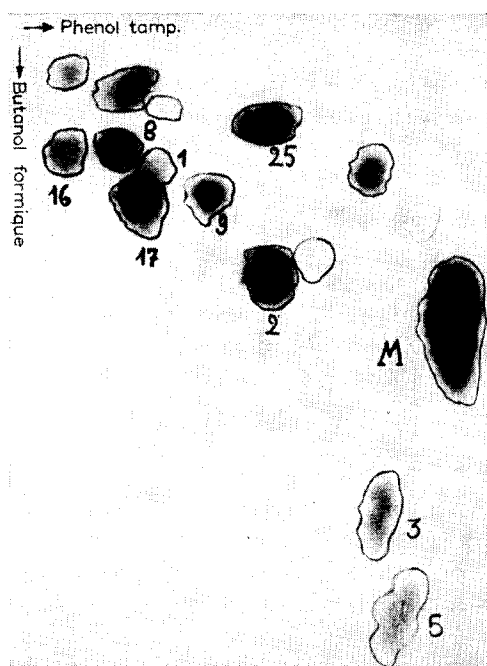


Fig. 1. Chromatogramme bidimensionnel de l'extrait de *Xeroocomus badius* (solvant (a)). 16, acide aspartique; 17, acide glutamique; 8, sérine; 1, glycine; 9, thréonine; 2, alanine; 3, valine; 5, leucines; 25, glutamine; M, acide aminé inconnu.

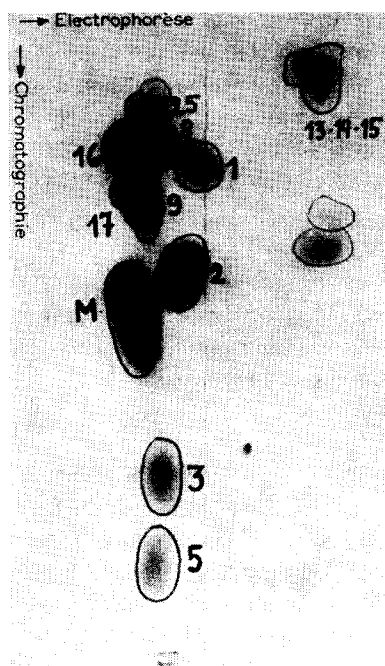


Fig. 2. Chromatoélectrorhéophorèse de l'extrait de *Xeroocomus badius*. Numérotation comme Fig. 1.

TABEAU I

COMPARAISON DES R_F DU SPOT M AVEC CEUX D'AUTRES ACIDES AMINÉS

Acides aminés	Phénol-tampon.	Phénol- NH_3	$\text{BuOH-HCO}_2\text{H}$	$\text{BuOH-CH}_3\text{CO}_2\text{H}$
M	0.81	0.81	0.38	0.32
Ac. glutamique	0.26	0.16	0.22	0.14
Alanine	0.47	0.51	0.32	0.21
Valine	0.72	0.70	0.53	0.42
Leucine	0.81	0.76	0.66	0.57

de 80 % en éthanol dans l'extrait filtré. L'extrait a été ensuite concentré sous pression réduite et évaporé à sec. La tyrosine, la phénylalanine et les matières colorantes ont été éliminées par adsorption sur du charbon traité par de l'acide acétique selon la méthode de PARTRIDGE¹⁴. Le filtrat final a été passé sur une colonne d'Amberlite IR-120 sous la forme H^+ et après lavage de la colonne à l'eau, les acides aminés ont été élués par une solution de $\text{NH}_3 \text{ N}$; l'éluat après concentration et dessiccation a donné un résidu de 5.2 g. La purification ultérieure de la substance a été achevée par chromatographie sur papier à l'aide de la technique décrite par FOWDEN¹⁵. Les feuilles de Whatman No. 3, après lavage avec les réactifs suivants: HCl 0.5 N; eau; NaOH 0.5 N; eau; alcool, ont été séchées à 40°. Le résidu précédent a été dissous dans 25 ml

d'eau et appliqué en une ligne continue sur 16 feuilles du papier préparé. Après séparation chromatographique avec le solvant *n*-butanol-acide acétique-eau et séchage, les parties de chromatogramme contenant la substance M ont été localisées à l'aide de spots témoins et éluées à l'eau. L'éluat a été enfin concentré et évaporé à sec. La recrystallisation du résidu dans le méthanol absolu a permis d'obtenir 430 mg de substance M sous forme de cristaux blancs et chromatographiquement pure.

La substance se dissout facilement dans l'eau, sa dissolution dans le méthanol est plus difficile.

Analyse élémentaire

Le produit, qui fond à 221°, donne à l'analyse: C:48.27 %; H:8.14 %; N (Kjeldahl):16.15 %; N (Van Slyke):15.07 %.

On peut déduire de ces résultats la formule brute: $C_7H_{14}O_3N_2$ qui donne les valeurs calculées: C:48.26 %; H:8.10 %; N:16.08 %.

Détermination de l'équivalent-gramme

(a) Titration par l'acide perchlorique en milieu anhydre (acide acétique glacial): 7.85 mg de la substance ont été titrés par 1.81 ± 0.01 ml de $HClO_4$ 0.025 *N*, ce qui correspond à un équivalent-gramme de 173. (b) Dosage à la ninhydrine selon VAN SLYKE, MACFADYEN ET HAMILTON¹⁶. Une prise d'essai de 3.16 mg a été attaquée par la ninhydrine et le CO_2 dégagé absorbé par 3 ml de baryte correspondant à 11.54 ml de HCl 0.02 *N*. L'excès de baryte a nécessité 9.74 ± 0.02 ml et la prise d'essai 1.8 ml de HCl 0.02 *N* ce qui correspond à un équivalent-gramme de 175.

Détermination du poids moléculaire

La méthode de BARGER¹⁷ donne 174, ce qui permet de conclure à l'identité des formules brute et moléculaire.

Hydrolyse de la substance

La substance a été hydrolysée pendant 20 h à 108°, d'une part en présence de HCl *N* et d'autre part en présence de HCl 6 *N*. Le résultat des deux hydrolyses a été identique, la tache correspondant à la substance a disparu des chromatogrammes avec apparition de deux spots nouveaux. Le 1er spot n'a pu être séparé de l'acide glutamique par chromatographie sur papier en utilisant les solvants décrits précédemment; de plus, ce composé a migré comme l'acide glutamique à l'électrorhéophorèse sur papier en présence d'un tampon phosphaté à pH = 5.6. Le second spot, de R_F semblables à ceux de l'éthylamine, a migré dans une direction identique à celle des substances basiques. Dans les mêmes conditions expérimentales, la substance non hydrolysée migre comme un acide aminé neutre.

L'hydrolyse alcaline du composé par la baryte saturée pendant un heure à 100° a scindé également la molécule en acide glutamique et en éthylamine; une très petite quantité de l'acide aminé est resté inchangée après l'hydrolyse.

Dosage de l'amine libérée par l'hydrolyse

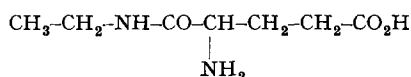
5.195 mg de substance ont été chauffés à reflux avec 3 ml de HCl 6 *N* pendant 5 h. La solution a été alors transférée quantitativement dans un semi-micro appareil

Mélangée à la substance naturelle, la substance synthétique n'a pas provoqué d'abaissement de point de fusion. Ses R_F dans les différents solvants utilisés pour la chromatographie sur papier sont semblables.

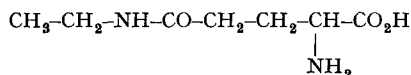
CONCLUSIONS

Sur la base des différents résultats expérimentaux obtenus, on peut conclure à l'identité du composé séparé avec la N-éthyl- γ -glutamine. La substance naturelle et le produit préparé par synthèse possèdent des propriétés chimiques et physiques identiques. Les résultats des hydrolyses acide et alcaline, les dosages d'acide glutamique et d'éthylamine sont tout à fait concordants et constituent la preuve de l'existence d'une liaison du type -NH-CO- entre l'acide glutamique et l'éthylamine. Les spectres infra-rouge des substances naturelle et synthétique en présence de KBr comme phase solide (concentration 1 mg pour 200 mg de KBr) sont absolument superposables comme le montre les Figs. 3 et 4.

La structure de la N-éthyl- γ -glutamine est semblable à celle d'un dipeptide avec le groupement glutamyle en position γ . SACHS ET BRAND²¹ ont montré que les peptides de ce type avec un groupement aminé et un groupement carboxyle libre libèrent 2 moles d'azote aminé par mole de substance lors du dosage de Van Slyke à l'acide nitreux. Dans les mêmes conditions, les α -glutamyl peptides donnent une mole d'azote aminé par mole de substance. Le rapport de l'azote aminé à l'azote total étant de 0.92, on peut rejeter une formule du type



pour adopter la structure suivante:



ce que confirme d'ailleurs la synthèse.

Différentes hypothèses peuvent être envisagées au sujet de la biosynthèse de l'acide aminé. On pourrait le considérer comme un produit de décarboxylation de la γ -glutamylalanine; cependant ce peptide n'a pas été trouvé par chromatographie

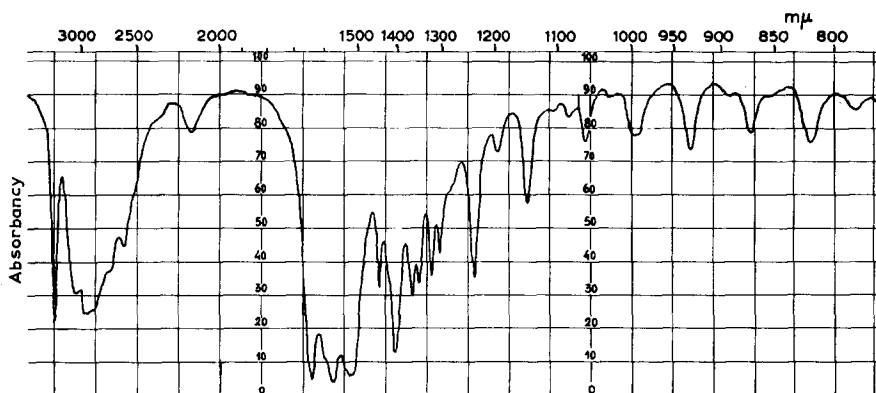


Fig. 4. Spectre infra-rouge de la N-éthyl- γ -glutamine synthétique.

sur papier de plusieurs extraits alcooliques de *Xerocomus badius*. De plus la décarboxylation dans les plantes de substances du type de l'acide glutamique se fait généralement aux dépens de la fonction acide voisine du groupement α aminé; c'est le cas de l'acide γ -aminobutyrique qui est beaucoup plus répandu dans le règne végétal que l'acide α -aminobutyrique.

Certains enzymes du type glutamotransférase, isolés de bactéries, sont capables de catalyser l'échange des groupes amidés de la glutamine ou de l'asparagine avec l'hydroxylamine. WAELSCH *et al.*²² ont ainsi préparé des acides hydroxamiques par action d'enzymes extraits de *Proteus vulgaris*; la synthèse de ces mêmes acides hydroxamiques est également possible à partir d'acide glutamique ou d'acide aspartique mais cette dernière réaction, qui est utilisée comme modèle pour la synthèse de la glutamine, nécessite la présence d'adénosine triphosphate et de magnésium. Il serait possible de considérer que la N-éthyl- γ -glutamine se forme par transfert du radical glutamyle sur l'éthylamine à l'intervention de semblables enzymes.

Nous remercions le centre interuniversitaire de chimie organique pour l'aide qu'il nous a apportée au cours de cette recherche.

RÉSUMÉ

On a mis en évidence la présence d'un dérivé de l'acide glutamique dans la fraction soluble dans l'alcool du champignon *Xerocomus badius*. La substance a été isolée par chromatographie de partition sur papier et il a été prouvé qu'il s'agissait de la N-éthyl- γ -glutamine. La comparaison avec le composé synthétique a confirmé la structure proposée.

Finalement, on discute de quelques étapes possibles de la biosynthèse de cette substance.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. I. VIRTANEN ET P. K. HIETALA, *Acta Chem. Scand.*, 5 (1951) 220.
- ² A. I. VIRTANEN ET T. ETTALA, *Suomen Kemistilehti B*, 29 (1956) 107.
- ³ A. I. VIRTANEN ET T. ETTALA, *Acta Chem. Scand.*, 11 (1957) 182.
- ⁴ A. I. VIRTANEN ET A. M. BERG, *Acta Chem. Scand.*, 9 (1955) 553.
- ⁵ N. GROBBELAER, J. K. POLLARD ET F. C. STEWARD, *Nature*, 175 (1955) 703.
- ⁶ J. DONE ET L. FOWDEN, *Biochem. J.*, 49 (1951) Proc. XX et 51 (1952) 451.
- ⁷ R. M. ZACHARIUS, J. K. POLLARD ET F. C. STEWARD, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 1961.
- ⁸ A. I. VIRTANEN ET A. M. BERG, *Acta Chem. Scand.*, 8 (1954) 1090.
- ⁹ A. I. VIRTANEN ET T. ETTALA, *Acta Chem. Scand.*, 12 (1958) 787.
- ¹⁰ R. M. ZACHARIUS, C. J. MORRIS ET J. F. THOMPSON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 80 (1959) 199.
- ¹¹ E. F. MCFARREN, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 168.
- ¹² J. K. MIETTINEN, *Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A*, II, 58 (1954) 44.
- ¹³ S. GERLAXHE ET M. RENARD, C. R. VIIe Congr. Int. Chim. Ind., III, 1954, p. 509.
- ¹⁴ S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.*, 44 (1949) 521.
- ¹⁵ L. FOWDEN, *Biochem. J.*, 64 (1956) 323.
- ¹⁶ D. D. VAN SLYKE, R. T. DILLON, D. A. MCFAYDEN ET P. HAMILTON, *J. Biol. Chem.*, 141 (1953) 728.
- ¹⁷ G. BARGER, *J. Chem. Soc.*, (1904) 286.
- ¹⁸ J. BARROILLIER, *Naturwissenschaften*, 42 (1955) 416.
- ¹⁹ N. LICHTENSTEIN, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) 1022.
- ²⁰ E. FISHER ET C. BOEHNER, *Ber.*, 44 (1911) 1332.
- ²¹ H. SACHS ET E. BRAND, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 3601.
- ²² N. GROSSOWICZ, E. WAINFAN, E. BOREK ET H. WAELSCH, *J. Biol. Chem.*, 187 (1950) 111.
- ²³ Y. SAKATO, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 23 (1950) 262.