

this point. In any case, the present study has demonstrated that the predominant amino acid derivatives in *G. palpalis* are acidic in nature.

It would be of interest to compare the profiles of amino acids and related compounds in the tsetse fly with those of other dipterous insects which have been investigated by comparable methods. Together with the present results, available data of 1-day-old adult flies of *Culex pipiens*⁹ and *D. melanogaster*⁶ as well as newly hatched adult flies of *Phormia regina* (unpublished data by amino acid analyzer) are presented in the Table. Since at such early stages the patterns in both sexes are quite similar, the data of adult males and females in the last 3 species were pooled. Alanine has by far the highest concentration among all amino acids in the tsetse fly. Compared to *Drosophila*, *Culex* and *Phormia*, its contents of aspartic acid, glutamic acid and tryptophan are also remarkably high. On the other hand, the relative concentration of proline amounts to only $1/9$ – $1/3$ of that in the other 3 insects. Since the endogenous pool of this amino acid is low, for fulfilling its function as energy reserve a large part of it must be derived from the ingested blood⁹.

Zusammenfassung. Mittels Ionenaustausch-Chromatographie konnten 37 freie Ninhydrin-positive Stoffe in adulten Tsetse-Fliegen, *Glossina palpalis*, aufgetrennt werden. Die meisten Derivate der Aminosäuren wurden vor der Asparaginsäure aus der Harzsäule eluiert, was auf ihre saure Natur hindeutet.

R. A. BALOGUN¹⁰,
F. HANIMANN and P. S. CHEN

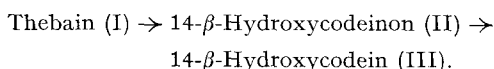
Zoologisches Institut der Universität,
8006 Zürich (Switzerland), 10 October 1968.

⁹ This work was supported by grants from the Swiss National Science Foundation and the Georges und Antoine Claraz-Schenkung.

¹⁰ Visiting scientist from the Department of Zoology, University of Ife, Ile-Ife, Nigeria. The financial assistance received from the University for my visit to Zürich is greatly appreciated. I wish to thank the staff (Entomology Section) of the Nigerian Institute for Trypanosomiasis Research, Kaduna, for the supply of *Glossina palpalis* pupae.

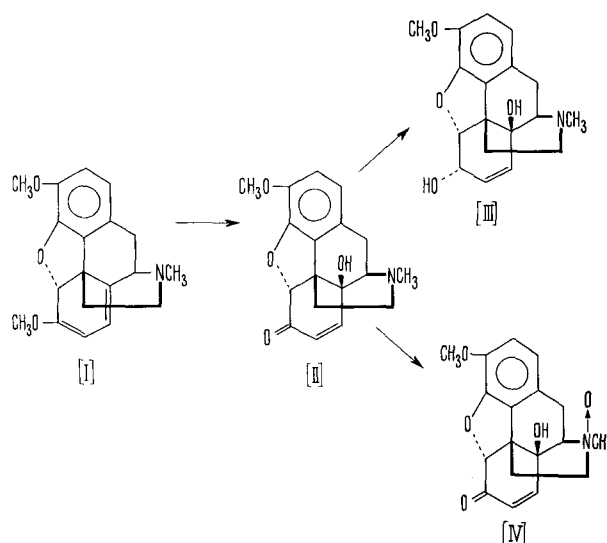
Mikrobielle Umwandlung von Thebain

Die mikrobielle Umwandlung von Alkaloiden, bei denen das Grundgerüst des Substrates weitgehend erhalten bleibt, ist erst in den letzten 10 Jahren untersucht worden^{1,2}. Am häufigsten wurden Morphinane, Indol- und Steroidalkaloide eingesetzt. Eingehende Untersuchungen zur Umwandlung von Alkaloiden der Morphin-Reihe sind im Arbeitskreis von TSUDA in Japan durchgeführt worden^{3–8}. Im Rahmen eines umfangreichen Screening-Programms hat man 1700 verschiedene Bakterien- und Pilzstämmen auf ihre Fähigkeit, Thebain umzuwandeln, getestet. Insgesamt liessen sich 120 «Thebain umwandelnde Stämme» selektieren; meist handelt es sich um Basidiomyceten. Beim Einsatz des holzerstörenden Pilzes *Trametes sanguinea* (L. EX FR.) Lloyd liessen sich nach Zugabe von Thebain zur Fermentationslösung 2 Hauptprodukte isolieren, nämlich 14- β -Hydroxycodeinon (II) und 14- β -Hydroxycodein (III). Die Ausbeuten von (II) und (III) nach Zugabe von Thebain war abhängig von der eingesetzten Nährlösung. Folgende Sequenz der Umwandlung konnte gesichert werden:



Die mikrobielle Umwandlung verschiedener 6,14-endo-Äthenotetrahydrothebaine ist kürzlich von MITSCHER et al.⁹ beschrieben worden. *Cunninghamella echinulata* (NRRL-A-11498)-Kulturen sind in der Lage, u. a. die Methylgruppe am Piperidino-Stickstoff abzuspalten. Entalkylierungen in der Morphin-Reihe durch mikrobielle Enzyme waren bislang nicht bekannt.

Wir untersuchten die Umwandlung von Thebain mittels holzerstörender Pilze der Gattung *Trametes* europäischer Herkunft. Insgesamt wurden 35 Stämme verschiedener *Trametes*-Arten geprüft. Die Kultivation wurde in einer 4prozentigen Malzextraktlösung (NL 1) durchgeführt. Die meisten Stämme waren in der Lage, das Substrat (I) umzuwandeln, wobei neben einer Hauptkomponente A verschiedentlich noch mehrere Produkte



¹ K. TSUDA, I.A.M. Symposia on Microbiology Nr. 6, Tokyo (1964).

² D. GRÖGER, in *Biosynthese der Alkaloide* (Ed. K. Mothes und H. R. Schütte; VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, im Druck).

³ K. IZUKA, S. OKUDA, K. AIDA, T. ASAI, K. TSUDA, M. YAMADA und I. SEKI, *Chem. pharm. Bull.*, Tokyo 8, 1056 (1960).

⁴ K. IZUKA, M. YAMADA, J. SUZUKI, I. SEKI, K. AIDA, S. OKUDA, T. ASAI und K. TSUDA, *Chem. pharm. Bull.*, Tokyo 10, 67 (1962).

⁵ M. YAMADA, K. IZUKA, S. OKUDA, T. ASAI und K. TSUDA, *Chem. pharm. Bull.*, Tokyo 10, 981 (1962).

⁶ M. YAMADA, K. IZUKA, S. OKUDA, T. ASAI und K. TSUDA, *Chem. pharm. Bull.*, Tokyo 11, 206 (1963).

⁷ M. YAMADA, *Chem. pharm. Bull.*, Tokyo 11, 356 (1963).

⁸ K. AIDA, K. UCHIDA, K. IZUKA, S. OKUDA und T. UEMURA, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 22, 13 (1966).

⁹ L. A. MITSCHER, W. W. ANDRES, G. O. MORTON und E. L. PATTERSON, *Experientia* 24, 133 (1968).

in Spuren nachweisbar waren. Bei einem Stamm von *T. cinnabarina* trat neben der Verbindung A noch eine zweite Hauptkomponente B auf. Bei der Kultivierung dieses Stammes in der NL 2 (Glucose 10,0 g; Pharmamedia®, Traders Protein Division, Fort Worth, USA 5,0 g; KH_2PO_4 2,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; Aqua dest. ad 1000,0 ml) liess sich Verbindung B in 40prozentiger und Verbindung A in 10prozentiger Ausbeute isolieren. Die Umsetzung ist also auch hier abhängig von der Zusammensetzung des Fermentationsmediums.

Die Verbindung A konnte durch Schmp., UV-, IR- und Massenspektren sowie Vergleich mit einem nach¹⁰ hergestellten synthetischen Präparat als 14- β -Hydroxycodeinon (II) identifiziert werden.

Das Produkt B erwies sich als 14- β -Hydroxycodeinon-N-oxid (IV). Besonders aufschlussreich war das Massenspektrum. Der Peak des Molekularions fand sich bei m/e 329. Die relative Intensität betrug 10%. Charakteristisch für aromatische N-Oxide ist das Auftreten von starken Peaks bei M-16 und M-17¹¹⁻¹³. In unserem Fall lag der «base-peak» bei der MZ 313 (M-16). Das Fragment der MZ 312 (M-17) erschien mit 65% der Intensität des «base-peaks». Im 100-MHz-NMR-Spektrum (aufgenommen in CDCl_3) war die Lage der aromatischen Protonen und der Doppelbindungsprotonen am C-7 und C-8 in beiden Verbindungen (II und IV) identisch. Das gleiche trifft für die Protonen der OCH_3 -Gruppe zu. Das Drei-Protonen-Singulett bei 7,67 ppm (τ -Skala) (N-CH_3) von II war bei IV zu niedriger Feldstärke verschoben (typisch für aromatische N-Oxide).

Das Produkt B zeigte ferner die gleichen Eigenschaften wie eine nach der Vorschrift von SPEYER und STARRE¹⁴ hergestellte Vergleichsprobe von 14- β -Hydroxycodeinon-N-Oxid.

Ebenso wie bei den japanischen Autoren trat auch bei unseren Versuchen als erstes Umwandlungsprodukt von (I) 14- β -Hydroxycodeinon (II) auf. Bei den meisten der von uns geprüften Stämme war II das Endprodukt. *T. cinnabarina* war in der Lage, II zu IV zu oxydieren. Im Gegensatz zu den japanischen Stämmen liess sich das Reduktionsprodukt von II, das 14- β -Hydroxycodein, nur gelegentlich in Spuren nachweisen, aber nicht kristallin fassen.

Die Bildung von N-Oxiden bei der mikrobiellen Umwandlung von Naturstoffen ist unseres Wissens bisher noch nicht beschrieben worden.

Summary. Thebaine was transformed into 2 products by fermentation with a strain of *Trametes cinnabarina*. The 2 compounds were isolated and identified as 14- β -hydroxycodeinone and 14- β -hydroxycodeinone-N-oxid.

D. GRÖGER und H. P. SCHMAUDER

*Institut für Biochemie der Pflanzen
der Deutschen Akademie der Wissenschaften,
401 Halle/Saale (DDR), 21. Juni 1968.*

¹⁰ M. FREUND und E. SPEYER, J. prakt. Chem. 94, 135 (1916).

¹¹ T. A. BRYCE und J. R. MAXWELL, Chem. Commun. 206 (1965).

¹² R. GRIGG und B. D. ODELL, J. chem. Soc. (B) 218 (1966).

¹³ A. TATEMATSU, H. YOSHIZUMI, E. HAYASHI und H. NAKATA, Tetrahedron Lett. 2985 (1967).

¹⁴ E. SPEYER und K. STARRE, Ber. dt. chem. Ges. 57, 1409 (1924).

Oral and Parenteral Toxicity of *Bacillus thuringiensis* 'Exotoxin', and its Inactivation in Larvae of *Galleria mellonella*

McCONNEL and RICHARDS¹ found evidence for the presence of the so-called 'exotoxin' of *Bacillus thuringiensis* (ET) by injecting autoclaved culture medium of this bacillus into the hemocoel of larvae of *Galleria*. They claimed that the active substance was not toxic for the same insect when given orally. In other insects, however, it has been found that the ET is active when ingested^{2,3}, and recently it was demonstrated that *Galleria* too was susceptible to the orally applied substance^{4,5}. Thus *Galleria* would differ from many other insects only in so far as relatively high concentrations of ET are needed for oral intoxication. However, no exact comparisons have been published as yet.

Our work with *Galleria* was undertaken in order to clarify the quantitative relations between oral and parenteral toxicity. At the same time we wanted to know why larvae of *Galleria* were less susceptible to the orally applied substance. Two hypotheses had to be tested: (1) The toxic substance might be absorbed so slowly by the gut epithelium that only very small quantities could reach the hemocoel, whereas the majority of it would be eliminated with the feces. (2) The toxic substance could be inactivated in the intestinal tract by enzymatic degradation and/or formation of an inactive complex.

Thirty-day-old larvae (40–60 mg) were injected via an abdominal proleg with 0.5 μl of different concentrations

of ET, prepurified by differential precipitation⁶. Other larvae of the same age and weight were put singly in glass tubes, each containing 50 mg of rearing medium with different amounts of ET. After 6 days, when the larvae had fed all the medium, new untreated food was given. Thus the amount of ET fed per larva was known. In both types of experiments the mortality was recorded. The data were corrected for spontaneous mortality (8–10%) and subjected to probit analysis, using 2 computer programmes⁷. In this paper doses are expressed as μl of our standard solution of prepurified ET.

Figure 1 shows the 2 dosis-mortality curves with their 95% fiducial limits for larvae which were injected and fed ET. The 2 respective LD_{50} values and the slopes (b) of the curves are 0.0078 $\mu\text{l}/\text{larva}$ ($b = 2.03 \pm 0.44$), and

¹ E. McCONNEL and A. G. RICHARDS, Can. J. Microbiol. 5, 161 (1959).

² J. D. BRIGGS, J. Insect Path. 2, 418 (1960).

³ A. BURGERJON and H. DE BARJAC, C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci. Paris T 251, 911 (1960).

⁴ J. VANCOVA, Acta ent. bohemoslav. 63, 10 (1966).

⁵ A. KRIEG, Anz. Schädlingssk. 40, 8 (1967).

⁶ G. BENZ, Experientia 22, 81 (1966).

⁷ J. R. DAUM and W. KILLCREAS, Bull. ent. Soc. Am. 72, 365 (1966).