

# LEUCIN-CARBOXYLYASE AUS MARINEN RHODOPHYCEAE: VORKOMMEN, VERBREITUNG UND EINIGE EIGENSCHAFTEN

THOMAS HARTMANN

Pharmakognostisches Institut der Universität, 53 Bonn 1, BRD, Germany

(Received 15 December 1970)

**Abstract**—The occurrence of a substrate-unspecific L-leucine carboxylyase in marine red algae has been demonstrated. The enzyme was found to occur in 13 out of 27 species tested. The very stable enzyme appears to be firmly particle-bound. All attempts to demonstrate activity in solution so far failed. Preparations obtained by acetone-treatment of fresh or preserved algae, which were further purified by exhaustive aqueous extraction were found suitable for detailed enzyme studies. The enzymic reactions have distinct pH optima in the range of 4.25 to 6.0. The precise values depend on the algal species the enzymes are derived from. In addition to leucine, the following amino acids were decarboxylated: norleucine, isoleucine, valine, norvaline, 2-aminobutyric acid, alanine, 2-aminoheptanoic acid, phenylalanine, methionine, cysteine, homocysteine. It has been confirmed that all these substrates are decarboxylated by a single enzyme. With two exceptions pyridoxalphosphate (PALP) was necessary to obtain full activity. But even in the presence of PALP an unusual substrate-dependent inactivation occurs. This inactivation was highest in fresh preparations but decreased during the storage of enzymic material.

## EINLEITUNG

Die im Pflanzenreich verbreitet vorkommenden einfachen aliphatischen Monamine können auf zwei Wegen entstehen: durch Aminierung entsprechender Aldehyde,<sup>1-3</sup> oder durch Aminosäuredecarboxylierung. Über Aminosäuredecarboxylasen, die mit aliphatischen Monoaminomonocarbonsäuren reagieren ist wenig bekannt. Das einzige näher charakterisierte Enzym ist die bakterielle Valin-Carboxylyase (EC 4.1.1.14) aus *Proteus vulgaris*, die neben Valin auch Leucin, Isoleucin, Norvalin, 2-Aminobuttersäure und Phenylalanin umsetzt.<sup>4</sup> Decarboxylaseaktivität gegenüber einzelnen aliphatischen Aminosäuren wird für einige pflanzliche Organismen angegeben: Decarboxylierung von Valin durch Spadix-Extrakte von *Arum maculatum*,<sup>5</sup> von Valin und Leucin durch Blütenextrakte von *Sorbus aucuparia* und *Crataegus monogyna*<sup>6</sup> und die Decarboxylierung von Alanin und Serin durch zellfreie Extrakte aus Gurkenkeimlingen und *Ecballium elaterium*.<sup>7</sup> Lebendes Mycel von *Claviceps purpurea* decarboxyliert u.a. Leucin und 2-Aminoheptansäure zu den entsprechenden im Mutterkorn vorkommenden Aminen.<sup>8</sup> Die gemessenen Substratumsätze sind in den genannten Fällen sehr gering, eine Charakterisierung der verantwortlichen Enzymsysteme steht noch aus.

<sup>1</sup> T. HARTMANN, *Z. Pflanzenphysiol.* **57**, 368 (1967).

<sup>2</sup> M. STEINER, T. HARTMANN, D. DÖNGES and E. BAST, *Naturwissenschaften* **54**, 370 (1967).

<sup>3</sup> T. HARTMANN, D. DÖNGES und M. STEINER, (in Vorbereitung).

<sup>4</sup> L. EKLADIUS, H. K. KING and C. R. SUTTON, *J. gen. Microbiol.* **17**, 602 (1957).

<sup>5</sup> N. W. SIMON, *J. Exp. Botany* **13**, 1 (1962).

<sup>6</sup> M. RICHARDSON, *Phytochem.* **5**, 23 (1966).

<sup>7</sup> O. J. CROCOMO and L. FOWDEN, *Phytochem.* **9**, 537 (1970).

<sup>8</sup> T. HARTMANN, *Planta* **66**, 191 (1965).

In der vorliegenden Arbeit wird eine Decarboxylase aus marinen Rotalgen beschrieben, die mit zum Teil erstaunlich hoher Aktivität aliphatische neutrale Aminosäuren zu den entsprechenden Aminen abbaut.

### ERGEBNISSE

#### Gewinnung geeigneter Enzympräparate

**Enzymstabilität.** Vorversuche zeigten, daß Aceton-trockenpulver, die aus tiefgefrorenem Algenmaterial, das bereits über ein Jahr bei  $-18^{\circ}$  lagerte, Leucin mit hoher Aktivität zu Isoamylamin decarboxylieren. Spätere Experimente, die von Frischmaterial ausgingen, bestätigten die hohe Stabilität des Enzymsystems (Tabelle 1). Die Decarboxylaseaktivität läßt sich in tiefgefrorenem und gefriergetrocknetem Material oder Aceton-trockenpulvern über mehrere Jahre ohne Aktivitätsverlust konservieren.

TABELLE 1. STABILITÄT DER LEUCIN-CARBOXYLYASE  
IN VERSCHIEDENEN ROHPRÄRARATEN

Enzympräparat	$\mu\text{l CO}_2/\text{Std}/\text{mg Trockengewicht}$	
	<i>Cystoclonium purpureum</i>	<i>Ceramium rubrum</i>
Frischmaterial	24,2	12,3
Trockenpulver	5,4*	12,1
Acetonpulver-1	25,3	14,4
Acetonpulver-2	26,9	16,0
Acetonpulver-3	27,6	15,5

Ansatz mit  $2 \times 10^{-2}\text{M}$  Leucin und  $10^{-3}\text{M}$  PALP.  
 Acetonpulver-1 = API aus Frischmaterial  
 Acetonpulver-2 = API aus 4 Wochen altem  
 Trockenpulver  
 Acetonpulver-3 = API aus 4 Wochen altem  
 Gefriermaterial

\* Beim direkten Test immer stark gehemmt,  
 nach Acetonextraktion vollaktiv.

**Zur Enzymextraktion.** Alle Versuche Decarboxylaseaktivität in partikelfreien Extrakten nachzuweisen verliefen negativ. Die wichtigsten, mit besserer Kenntnis der Enzymeigenschaften mannigfach variierten, Verfahren, mit denen eine Enzymextraktion versucht wurde, sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Ungenügender Zellaufschluß scheidet mit Sicherheit als Grund für die negativen Ergebnisse aus. Mit dem zum Aufschluß von Meeresalgen besonders geeigneten<sup>9-11</sup> Potter-Elvehjem-Homogenisator läßt sich ein praktisch 100%iger Zellaufschluß erzielen. Da auch der Zusatz verschiedener Detergentien zu Potter-Elvehjem-Homogenaten völlig wirkungslos ist, vermuten wir, daß das Enzymsystem sehr fest (möglicherweise covalent) strukturgebunden ist. Eine Partikelfraktionierung gelang bisher wegen der stark ausquellenden Membrankolloide nicht.

<sup>9</sup> G. JACOBI, *Planta* **49**, 1 (1957).

<sup>10</sup> E. OHMANN, *Publ. staz. zool. Napoli* **33**, 331 (1963).

<sup>11</sup> H. ZIEGLER und I. ZIEGLER, *Planta* **72**, 162 (1967).

TABELLE 2. *Polysiphonia urceolata*. VERHALTEN DER DECARBOXYLASE-AKTIVITÄT BEI VERSCHIEDENEN EXTRAKTIONSVERFAHREN

Art der Extraktion	Prozent der eingesetzten Enzymaktivität	
	In der löslichen Fraktion	Im Rückstand
P-E-Homogenate von A, B, C, D, bereitet und extrahiert in: H <sub>2</sub> O, Phosphatpuffer (0,05-1 m; pH 5,5-8,0), Citratpuffer (0,2 m; pH 3,0-6,0), Tris-Puffer (0,1 m; pH 7,5-9,0). Extraktionsdauer 0,5-4 Std. bei 4° oder Raumtemperatur	0	10-90
2-stündige Extraktion von D in 0,1; 0,2 oder 0,5 M Phosphatpuffer pH 5,5 bei 50°	0	60-90
P-E-Homogenate von B, D in 0,25 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 3 % KCl oder 20% Äthanol. Extraktion 2 Std bei Raumtemperatur	0	10-40
P-E-Homogenate von D in 0,2 m Phosphatpuffer pH 5,5, versetzt mit entweder 1% (v/v) Triton-X-100; 1% (v/v) Tween-20 oder -80; 0,02% Digitonin; 0,02% Desoxycholat. Extraktion 2 Std. bei Raumtemperatur	0	60-90
P-E-Homogenate von B oder D 1 Std. in 20% n-Butanol (2-Phasengemisch) oder 5% Butanol (1-Phasengemisch) extrahiert. Überstand nach Zentrifugation sofort lyophilisiert	0	50-80

Decarboxylierungsansatz mit  $2 \times 10^{-2}$ M Leucin und  $10^{-3}$ M PALP.

A = Frischalgen, B = tiefgefrorenes Material, C = Trockenpulver, D = Acetonpulver (APII).

P-E = Potter-Elvehjem.

*Aceton-Partikelpräparate.* Bei enzymkinetischen Versuchen ließen sich zwischen zellfreien Partikelpräparaten und Präparaten, die durch direkte Acetonbehandlung des Algenmaterials gewonnen wurden, keine Unterschiede feststellen. Es wurde deshalb im weiteren auf Zellaufschluß verzichtet. Folgende Präparate wurden verwendet:

- (a) Acetonrohpräparate (API), die ohne weitere Reinigung wahlweise aus Frischalgen oder konserviertem Material bereitet wurden.
- (b) Gereinigte Acetonpräparate (APII), die durch intensive wäßrige Extraktion aus API gewonnen wurden.

APII ist von wasserlöslichen Begleitstoffen befreit; Aminosäuren, Amine und NH<sub>3</sub> lassen sich höchstens in Spuren nachweisen. Trotz der starken Quellfähigkeit der Präparate waren Störungen durch Permeationsbarrieren bis zu Ansätzen mit 25 mg AP/ml nicht zu beobachten.

#### *Vorkommen und Verbreitung des Enzyms*

*Rhodophyceae.* Die überprüften Arten sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Leucin-Decarboxylierung wurde jeweils durch manometrische Bestimmung und Aminnachweis gesichert. 13 der untersuchten Arten decarboxylieren Leucin mit z. T. erstaunlich hohen Aktivitäten—siehe etwa *Ceramium deslongchampsii* u. *Cystoclonium purpureum*. Weitere 5 Arten (Tabelle 3 'Amin positiv') bilden in Gegenwart von Leucin Isoamylamin, allerdings

in so geringen Mengen, daß sie sich manometrisch nicht erfassen ließen. Unter den übrigen Arten, die Leucin nicht decarboxylieren, befindet sich neben allen Bangioideae auch die einzige geprüfte Süßwasserfloridee *Lemanea torulosa*.

Bei mehreren Arten wurde die Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Algen und vom Standort verfolgt. Die Aktivitätsunterschiede waren durchweg gering.

TABELLE 3. DECARBOXYLIERUNG VON L-LEUCIN DURCH ACETONPRÄPARATE VERSCHIEDENER ROTALGEN

Art	$\mu\text{l CO}_2/\text{Std}/\text{mg API}$			
	vollst. Ansatz	ohne PALP	ohne Leucin	pH- Optimum
<b>Porphyridiales</b>				
<i>Porphyridium purpureum</i> (Bory) Drew und Ross	0		(Amin negativ)†	
<i>Porphyridium violaceum</i> Kornmann	0		(Amin negativ)	
<b>Bangiales</b>				
<i>Bangia fuscopurpurea</i> (Dillw.) Lyngb.	0		(Amin negativ)	
<i>Porphyra umbilicalis</i> (L.) J.Ag.	0		(Amin negativ)	
<b>Nemalionales</b>				
<i>Rhodochorton purpureum</i> (Lightf.) Rosenv.	0		(Amin negativ)	
<i>Bonnemaisonia hamifera</i> Hariot	2,8	1,6	0	(5-6)‡
<i>Trailliella intricata</i> * Batt.	1,8	0,8	0	(5-6)
<i>Lemanea torulosa</i> (Roth.) J.Ag.	0		(Amin negativ)	
<b>Gigartinales</b>				
<i>Furcellaria fastigiata</i> (L.) Lamour.	1,2	1,2	0	(4-6)
<i>Cystoclonium purpureum</i> (Huds.) Batt.	49,6	6,3	0	6,0
<i>Phyllophora brodiaei</i> (Turn.) Endl.	5,2	1,8	0	(5-6)
<i>Phyllophora membranifolia</i> (Good. et Woodw.) J.Ag.	2,2	0,4	0	(5-6)
<i>Plocamium vulgare</i> Lamour.	0		(Amin Spuren)	
<i>Ahnfeltia plicata</i> (Huds.) Fries	0		(Amin Spuren)	
<i>Chondrus crispus</i> Stackh.	0		(Amin Spuren)	
<b>Cryptomeniales</b>				
<i>Hildenbrandia prototypus</i> Nardo	0		(Amin negativ)	
<i>Corallina officinalis</i> L.	—		(Amin Spuren)	
<i>Dumontia incrassata</i> (O. F. Müll.) Lamour.	1,3	1,3	0	(4-5)
<i>Polyides rotundus</i> (Huds.) Grev.	14,6	3,2	0	5,5
<b>Rhodymeniales</b>				
<i>Lomentaria articulata</i> (Huds.) Lyngb.	0		(Amin positiv)	
<i>Rhodymenia palmata</i> (L.) Grev.	0		(Amin positiv)	
<b>Ceramiales</b>				
<i>Ceramium deslongchampii</i> Chauv. in Duby.	96,4	13,7	0	4,25
<i>Ceramium rubrum</i> (Huds.) J.Ag.	13,7	4,3	0	5,0
<i>Delesseria sanguinea</i> (Huds.) Stackh.	1,5	0,5	0	5,5
<i>Laurencia pinnatifida</i> (Huds.) Lamour.	0		(Amin positiv)	
<i>Membranoptera alata</i> (Huds.) Stackh.	0		(Amin positiv)	
<i>Polysiphonia nigrescens</i> (Huds.) Stackh.	4,3	0,8	0	4,25
<i>Polysiphonia urceolata</i> (Lightf. ex Dillw.) Grev.	21,1	5,5	0	5,5
<i>Rhodomela confervoides</i> (Huds.) Silva	0		(Amin positiv)	

Vollst. Ansatz: 2,5-50 mg API,  $10^{-3}\text{M}$  PALP,  $2 \times 10^{-2}\text{M}$  Leucin.

\* Tetrasporophyt von *Bonnemaisonia hamifera*.

† 'Amin negativ' = nach Inkubation mit Leucin im vollst. Ansatz kein i-Amylamin nachweisbar.

'Amin positiv' = signifikante i-Amylaminproduktion nach Inkubation mit Leucin. 'Amin Spuren' = i-Amylamin nach Inkubation mit Leucin in Spuren nachweisbar.

‡ Optimaler pH-Bereich, exaktes Optimum nicht festgelegt.

Die höchsten Aktivitäten wurden stets in vollentwickelten Pflanzen gemessen. Mit epiphytischen Diatomeen stark besetztes Material zeigte immer eine reduzierte Enzymaktivität.

Deutliche und konstante Aktivitätsunterschiede sind zwischen den verschiedenen Fortpflanzungsformen einer Art zu beobachten. Bei *Ceramium rubrum* (Tabelle 4) und *Polysiphonia urceolata*—zwei Arten mit isomorphem Generationswechsel—fanden wir in den weiblichen Pflanzen stets deutlich höhere Decarboxylaseaktivitäten als in männlichen Pflanzen und Tetrasporophyten. Ähnliche von der Art der Fortpflanzungsformen abhängige Unterschiede in den Aktivitäten sind für die Aldolase und NADP-abhängige Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase bekannt.<sup>12</sup>

TABELLE 4. DECARBOXYLASE-AKTIVITÄTEN IN GAMETOPHYTEN UND SPOROPHYTEN VON *Ceramium rubrum*. (3 STANDORTE)

Fortpflanzungsform	$\mu\text{l CO}_2/\text{Std./mg API}$		
	1	2	3
Weibliche Pflanze	28,4	17,5	10,5
Männliche Pflanze	12,1	5,4	—
Tetrasporophyt	7,1	6,3	4,6

Ansatz mit  $2 \times 10^{-2}$  M Leucin und  $10^{-3}$  M PALP.

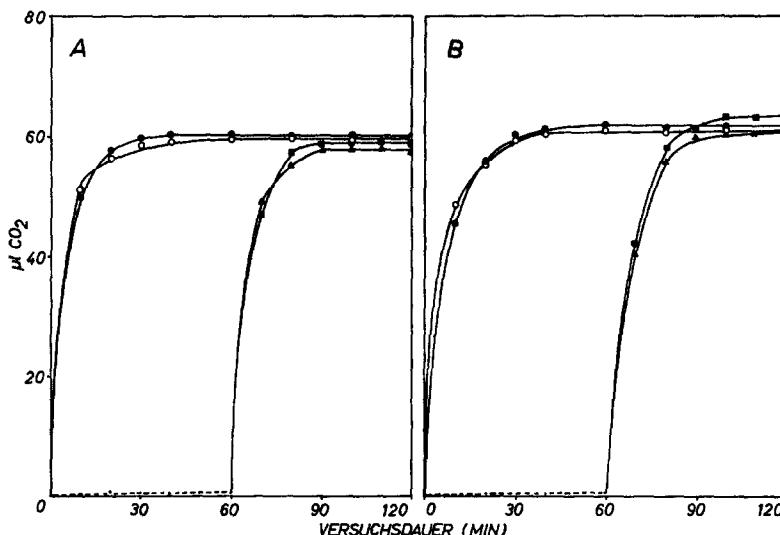


ABB. 1. REAKTIONSKURVEN DER LEUCIN-DECARBOXYLIERUNG DURCH (A) *Dumontia incrassata*, (B) *Furcellaria fastigiata*.

Ansatz mit 50 mg API und  $2 \times 10^{-2}$  M Leucin. Start der Reaktion durch Zugabe von Substrat

bei  $t_0$ : ●—● + PALP; ○—○ - PALP.

Start bei  $t_{60}'$ : ■—■ + PALP; ▲—▲ - PALP.

<sup>12</sup> H. ZIEGLER, I. ZIEGLER und H. J. SCHMIDT-CLAUSEN, *Planta* 81, 169 (1968).

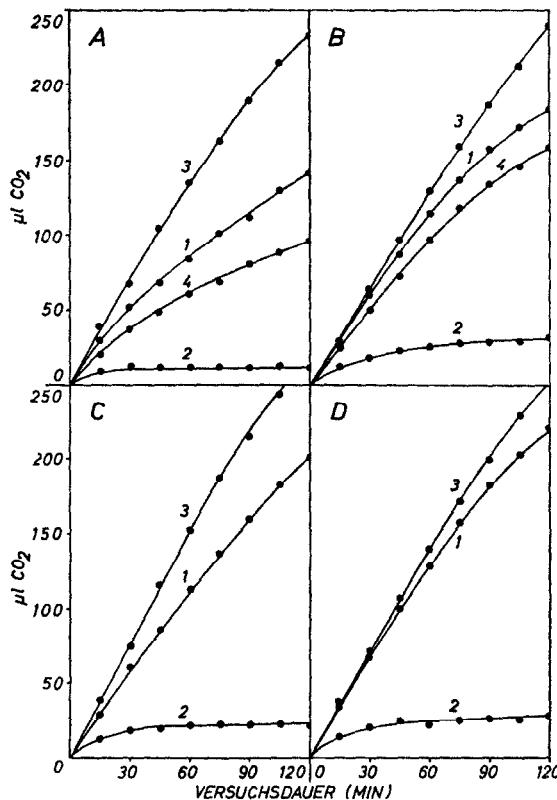


ABB. 2. REAKTIONSKURVEN DER LEUCIN-DECARBOXYLIERUNG DURCH (A) *Cystoclonium purpureum*, (B) *Ceramium rubrum*, (C) *Ceramium deslongchampsii*, (D) *Polyides rotundus*.

Kurven 1: API aus Frischmaterial (sofort geprüft). Kurven 2: wie 1, jedoch ohne PALP. Kurven 3: wie 1, jedoch 10 Monate gelagert. Kurven 4: ausgewaschene Partikelfraktion von 'frischem' API. Ansatz mit  $2 \times 10^{-2}$  M Leucin,  $10^{-3}$  M PALP (außer bei 2) und A: 2,5 mg AP, B: 10 mg AP, C: 1,5 mg AP, D: 10 mg AP.

*Andere Algen.* In anderen Algenklassen ließ sich die Leucin-Decarboxylase nicht nachweisen. Überprüft wurden marine Phaeophyceae, Chlorophyceae und Diatomeae sowie angereichertes Phytoplankton und axenische Kulturen einiger Cyanophyceae.

#### Eigenschaften des Enzyms

*Reaktionskinetik.* Fast alle Decarboxylasen werden durch Pyridoxal-5-phosphat (PALP) aktiviert (Tabelle 3). Ausnahmen machen lediglich die Enzyme aus *Dumontia* und *Furcellaria* (Fig. 1), bei denen die Reaktion auch in Gegenwart von PALP bereits 20–30 min nach Substratzugabe völlig zum Stillstand kommt. Der Aktivitätsabfall ist, wie Fig. 1 beweist, substratabhängig.

Die übrigen Decarboxylasen werden zwar durch PALP aktiviert, jedoch lässt sich auch hier ein substratabhängiger, durch PALP nicht reversibilisierbarer, Aktivitätsabfall beobachten (Fig. 2, Kurven 1). Bemerkenswert ist, daß dieser Aktivitätsabfall mit dem Alter der Enzympräparate abnimmt (Fig. 2, Kurven 3). Erschöpfende wässrige Extraktion von zellfreien Partikelhomogenaten hat dagegen keinerlei Wirkung (Fig. 2, Kurven 4). Der

Alterungseffekt läßt sich auch bei Algenmaterial beobachten, das in tiefgefrorenem oder getrocknetem Zustand gelagert wurde.

**pH-Optima.** Aus Tabelle 3 ist zu entnehmen, daß sich die pH-Optima der Decarboxylasen von Algenart zu Art beträchtlich unterscheiden können, aber immer im sauren pH-Bereich liegen. Die in fast allen Fällen sehr scharfen Optima sind streng artspezifisch und innerhalb der verschiedenen Fortpflanzungsformen einer Art konstant. Extremwerte finden sich mit einem Optimum von 4,25 bei *Ceramium deslongchampsii* und *Polysiphonia nigrescens* und einem Optimum von 6,0 bei *Cystoclonium purpureum*.

**Substratspezifität.** Die Algenpräparate decarboxylieren die 12 in Tabelle 5 aufgeführten Aminosäuren. Acht dieser Aminosäuren gehören zur homologen Reihe der nichtsubstituierten aliphatischen Monoaminomonocarbonsäuren. Alanin als niedrigstes und 2-Aminoheptansäure als höchstes Homologes dieser Reihe werden mit vergleichsweise nur sehr

TABELLE 5. WIRKUNGSSPEKTREN DER LEUCIN-CARBOXYLYASEN EINIGER ROTALGEN

Substrat	Relative Aktivität in %				
	I	II	III	IV	V
L-Leucin	100	100	100	100	100
L-Norleucin	34	39	39	29	24
L-Isoleucin	16	22	22	23	5
L-Valin	13	11	7	9	3
L-Norvalin	49	40	33	38	26
L-2-Aminobuttersäure	12	13	30	37	24
L-Alanin	< 3	< 2	< 1	< 3	< 3
D,L-2-Aminoheptansäure	< 3	< 2	< 1	< 3	< 3
L-Phenylalanin	8	53	3	5	27
L-Methionin	20	26	7	9	5
L-Cystein*	5	4	5	< 3	< 3
D,L-Homocystein*	16	17	13	13	8

I = *Polysiphonia urceolata*  $^{\text{a}}\text{CO}_2$  (Leucin): 15,6; II = *Cystoclonium purpureum*  $^{\text{a}}\text{CO}_2$  (Leucin): 56,4; III = *Ceramium deslongchampsii*  $^{\text{a}}\text{CO}_2$  (Leucin): 97,2; IV = *Ceramium rubrum*  $^{\text{a}}\text{CO}_2$  (Leucin): 13,8; V = *Polyides rotundus*  $^{\text{a}}\text{CO}_2$  (Leucin): 14,8.

Ansatz unter den für die einzelnen Enzyme optimalen Bedingungen mit APII,  $2 \times 10^{-2}\text{M}$  Substrat und  $10^{-3}\text{M}$  PALP.

\* Werte nicht mit den übrigen vergleichbar (s. Text).

geringer Aktivität umgesetzt. Weitere 25 Aminosäuren, unter ihnen Glycin, Isovalin und verschiedene Aminobuttersäuren werden nicht decarboxyliert. Wie zu erwarten, werden stereospezifisch nur die L-Formen der Substrataminosäuren umgesetzt. Besonderes Interesse verdient die Decarboxylierung der Schwefelaminosäuren. Umgesetzt werden nur Methionin, Cystein und Homocystein, nicht jedoch Strukturanaloge und Derivate dieser Aminosäuren wie Äthionin, Methioninsulfoxid, Serin, Homoserin und die Disulfide und Sulfonsäuren von Cystein und Homocystein. Da die beiden Mercaptoaminosäuren mit Carbonylverbindungen—so auch mit dem als Coenzym zugesetzten PALP—spontan zu Thiazolidin- bzw. Thiazanderivaten zyklisieren, läßt sich die optimale Reaktionsgeschwindigkeit, mit der diese Aminosäuren decarboxyliert werden, nur annähernd berechnen. Den Berechnungen wurden die Anfangsgeschwindigkeiten, der rasch abfallenden Reaktionskurven zugrunde gelegt. Die Werte in Tabelle 5 sind deshalb in quantitativer Hinsicht nicht mit den übrigen vergleichbar.

Trotz der z.T. sehr unterschiedlichen absoluten Aktivitäten, mit denen die Enzympräparate Leucin decarboxylieren (s. Legende zu Tabelle 5), ergibt, sich beim Vergleich der Wirkungsspektren ein recht einheitliches Bild. Auffallende quantitative Unterschiede lassen sich nur vereinzelt beobachten—etwa beim Isoleucin, Phenylalanin und Methionin. Dieser Befund ist verständlich, wenn man annimmt, daß alle Reaktionen durch ein unspezifisches Enzym katalysiert werden. Folgende Befunde unterstützen diese Annahme:

(a) Aus einheitlichem Frischmaterial mit verschiedenen Verfahren aufgearbeitete Enzympräparate, die Leucin mit sehr unterschiedlichen Aktivitäten decarboxylieren, unterscheiden sich in den relativen Aktivitäten ihrer Wirkungsspektren nicht voneinander.

(b) Die artspezifischen, für die Leucin-Decarboxylierung ermittelten, pH-Optima gelten jeweils für alle Substrataminosäuren.

(c) Bei gleichzeitigem Angebot von zwei Substraten läßt sich ein additiver Effekt nie beobachten (Tabelle 6).

TABELLE 6. DECARBOXYLIERUNG VON 2 GLEICHZEITIG GEBOTENEN SUBSTRATEN

Substrat	$^{\circ}\text{CO}_2$	Substrat	$^{\circ}\text{CO}_2$
Leucin	18,6	Leucin + Norleucin	15,7
Norleucin	5,8	Leucin + Norvalin	16,4
Norvalin	8,3	Valin + Isoleucin	3,2
Valin	1,9	Norleucin + Valin	4,8
Isoleucin	3,4	Norleucin + Norvalin	7,4
2-Aminobutters.	1,8	Valin + 2-Aminobutters.	1,8
Phenylalanin	1,4	Valin + Methionin	2,9
Methionin	3,6	Valin + Phenylalanin	1,7

Ansatz mit APII von *Polysiphonia urceolata*, je  $2 \times 10^{-2}\text{M}$  Aminosäure und  $10^{-3}\text{M}$  PALP.

Als Produkte der Decarboxylierungsreaktionen ließen sich in allen Fällen nur die jeweils zu erwartenden Amine nachweisen (Tabelle 7).

TABELLE 7. IDENTIFIZIERUNG DER DECARBOXYLIERUNGSPRODUKTE

Substrat	Identifiziertes Decarboxylierungsprodukt	$R_f$ -Werte*			$F^{\circ}\dagger$
		A	B	C	
Leucin	i-Amylamin	76	76	23	92
Norleucin	n-Amylamin	78	74	22	82
Isoleucin	2-Methylbutylamin	74	75	24	46-7
Valin	i-Butylamin	64	64	18	79,5
Norvalin	n-Butylamin	69	62	15	90,5
2-Aminobutters.	n-Propylamin	52	48	9	97
Alanin	Äthylamin	36	21	5	115
2-Aminoheptans.	n-Hexylamin	81	82	33	51
Phenylalanin	2-Phenylathylamin	74	49	4	157
Methionin	3-Methylmercaptopropylamin	59	25	4	63-4

\* A: PC der Aminhydrochloride an Papier-2043b (Schl. & Sch.) imprägniert mit 0,15 M Na-Ac. Fließmittel, n-Butanol-Wasser-Eisessig (50:49:1).<sup>20</sup> B: DC der DNP-Amine an Kieselgel-HF<sub>254</sub> (Merck), Fließmittel, n-Pentan-Essigsäure-iso-ämylester-NH<sub>3</sub> (70:29:1). C: DC der DNP-Amine an MgO-Kieselgur-G (Merck) (2:1), angesetzt in Polyäthylenglykol-400 (Fluka)-Äthanol (1:6). Fließmittel, n-Heptan gesättigt mit Polyäthylenglykol-400.<sup>12a</sup>

† Nicht korrigiert.

## DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungen erbringen den Nachweis eines in marinem Rotalgen verbreitet vorkommenden Enzymsystems, das Leucin und in geringerem Umfang elf weitere Aminosäuren zu den entsprechenden Aminen decarboxyliert. In seiner Substratspezifität ähnelt das Enzym der bakteriellen Valin-Carboxylyase (EC 4.1.1.14),<sup>4</sup> für die wir kürzlich das bisher bekannte Substratspektrum durch Methionin<sup>13</sup> und Norleucin und 2-Aminoheptansäure<sup>14</sup> erweitern konnten. Während die Decarboxylierung von Methionin auch für *Bacillus sphaericus*<sup>14</sup> und *Streptomyces* sp.<sup>15</sup> belegt werden konnte bei *Streptomyces* scheint es sich um ein streng substratspezifisches Enzym zu handeln<sup>16</sup> — ist u.W. über die Decarboxylierung der beiden freien Mercaptoaminosäuren noch nicht berichtet worden. Cysteamin ist zwar als Baustein von Coenzym-A ubiquitär verbreitet, entsteht jedoch erst im Zuge der Synthese aus 4-Phosphopantethenylcystein. Die für die Reaktion verantwortliche Phosphopantethenylcystein-Carboxylyase (EC 4.1.1.36) reagiert nicht mit freiem Cystein.<sup>17</sup>

Phenylalanin, das auch Substrat der bakteriellen Valin-Carboxylyase ist, wird außerdem durch die bakterielle Tyrosin-Carboxylyase (EC 4.1.1.25) und die auf tierische Gewebe beschränkte 'Decarboxylase für aromatische Aminosäuren' (DOPA-Carboxylyase, EC 4.1.1.26)<sup>18</sup> abgebaut. Es ist somit Substrat zweier in ihren Substratspezifitäten sehr verschiedener Gruppen von Decarboxylasen. Im einen Fall scheint der 'aliphatische Charakter' der Aminosäure für ihre Substrateignung ausschlaggebend zu sein, im anderen ihr 'aromatischer Charakter'.

Eine klare Korrelation besteht zwischen dem natürlichen Vorkommen einfacher Monoamine in Rotalgen und dem Nachweis der Decarboxylase. Sechs der aus Rotalgen nachgewiesenen Amine<sup>19</sup> sind Decarboxylierungsprodukte der Leucin-Carboxylyase.

## EXPERIMENTELLER TEIL

*Algenmaterial.* *Laurencia*, *Lomentaria* und *Rhodymenia* wurden im Mai 1967 an der Normandie-Küste (Frankreich), alle übrigen marinem Algen in den Monaten April–Mai 1967 auf Helgoland gesammelt. Die am natürlichen Standort geernteten Algen wurden sofort verlesen, von Verunreinigungen befreit und mehrfach mit gefiltertem Meerwasser gewaschen. Die gut zwischen Filterpapier abgepreßten Thalli wurden wahlweise (a) bei  $-18^{\circ}$  eingefroren, (b) gefriergetrocknet, (c) sofort zur Bereitung von Acetonpulvern oder Extraktten verwendet.

*Enzympräparate.* *Acetonrohrpräparate (API)*. 200 g Frischalgen, Gefriermaterial oder 10 g Trockenpulver wurden mit dem 10fachen Volumen Aceton von  $-18^{\circ}$  übergossen, 10 min im 'Waring Blender' extrahiert und dann scharf abgenutscht. Die Extraktion wurde mit dem 5fachen Volumen Aceton so oft wiederholt bis das Filtrat fast farblos erschien (4–6 Extraktionen). Nach Gefrier trocknung erhielt man ein staubfeines, homogenes Pulver, das bei  $-18^{\circ}$  gelagert wurde.

*Gereinigte Acetonpräparate (APII).* 10 g API wurden mit 500–1000 ml  $10^{-3}$  M Phosphatpuffer pH 7 von  $+4^{\circ}$  15 min im 'Waring Blender' extrahiert. Es wurde bei 3000 g zentrifugiert, der stark viscose Überstand verworfen und mit dem Rückstand die Extraktion so oft wiederholt, bis der wäßrige Überstand fast farblos und klar erschien (6–10 Extraktionen). Anschließend wurde wie oben mit Aceton behandelt und getrocknet.

*Enzymbestimmung.* Die Decarboxylierungsreaktion wurde manometrisch in der Warburg-Apparatur (Modell SL-85-G, Braun-Melsungen) verfolgt. Der Reaktionsraum des Warburggefäßes (Vol. ca. 13 ml) enthielt das eingewogene Enzympräparat, 1,4 ml Puffer und 0,2 ml PALP ( $10^{-2}$  M). Gestartet wurde die Reaktion durch Einkippen des Substrats aus dem Seitenarm (40  $\mu\text{mol}/0,4$  ml). Gesamtvolume des Ansatzes 2,0 ml. Alle Zusätze wurden im verwendeten Puffer angesetzt. Inkubiert wurde unter

<sup>13</sup> T. HARTMANN und E. BAST, *Arch. Mikrobiol.* **64**, 239 (1969).

<sup>14</sup> E. BAST, T. HARTMANN und M. STEINER, *Arch. Mikrobiol.* **79**, 12–24 (1971).

<sup>15</sup> H. HAGINO und K. YAKAYAMA, *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)*, **31**, 1367 (1967).

<sup>16</sup> H. HAGINO und K. YAKAYAMA, *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)*, **32**, 727 (1968).

<sup>17</sup> G. M. BROWN, *Ann. Rev. Biochem.* **32**, 419 (1963).

<sup>18</sup> W. LOVENBERG, H. WEISSBACH und S. UDENFRIEND, *J. Biol. Chem.* **237**, 89 (1962).

<sup>19</sup> M. STEINER und T. HARTMANN, *Planta* **79**, 113 (1968).

$N_2$ -Atmosphäre bei 37°.  $^{\circ}CO_2$  (bei mindestens über 1 Std. streng linearem Verlauf der Reaktionskurven =  $\mu l CO_2/Std./mg AP$ .

Puffersysteme: (a) Phosphatpuffer = 0,2 m  $KH_2PO_4/Na_2HPO_4$  (pH 5,5-8,0); (b) Citratpuffer = 0,2 m Citronensäure/0,2 m  $Na_2HPO_4$  (pH 3,0-6,0).

*Nachweis und Identifizierung der Decarboxylierungsprodukte (Amine).* Gewinnung. 0,5-2 g APII wurden in 50 ml Puffer nach Zusatz von 1 mmol Substrat und PALP ( $10^{-4}M$ ) unter  $N_2$  bei 37°, in einigen Versuchen Raumtemperatur, inkubiert. Nach 4-8 Std. wurde bei 3000 g zentrifugiert und der Überstand einer alkalischen Wasserdampfdestillation unterworfen.<sup>20</sup> Das in vorgelegter 0,1 n HCl aufgefangene Amindestillat wurde am Rotavapor bei < 40° eingedampft.

*DNP-Amine.* Die Aminhydrochloride wurden nach einer früher beschriebenen Methode<sup>21</sup> mit 1-Fluor-2,4-dinitrobezol in ihre 2,4-Dinitraniline (DNP-Amine) überführt und 3mal aus heißem MeOH unkristallisiert. Cysteamin und Homocysteamin wurden direkt im Decarboxylierungsansatz unter Ausschluß von Luftsauerstoff in ihre *O,N*-bis-DNP-Derivate überführt.

*Identifizierung.* Die Decarboxylierungsprodukte wurden im Vergleich zu authentischen Aminen aufgrund ihres chromatographischen Verhaltens und über die Schmelz- und Mischschmelzpunkte ihrer DNP-Derivate identifiziert (Tabelle 7). Die Identität von 3-Methylmercaptopropylamin, für das keine Vergleichsstanz zur Verfügung stand, wurde zusätzlich durch Elementaranalyse des DNP-Derivats bewiesen (Gef.: C 43,98; H 4,68; N 15,87; S 11,70.  $C_{10}H_{13}N_3O_4S_1$ . Ber.: C 44,27; H 4,83; N 15,49; S 11,82%).

Cysteamin und Homocysteamin wurden als DNP-Derivate dunnschichtchromatographisch an Kieselgel-H mit folgenden Fließmittelsystemen identifiziert: Benzol-Dioxan (3:1)  $R_f$  = 40 (Cysteamin);  $R_f$  = 53 (Homocysteamin). Tetrachlorkohlenstoff/Dioxan (4:1)  $R_f$  = 10 bzw. 15. Benzol-Athylacetat (1:1)  $R_f$  = 61 bzw. 72. Chloroform-Athanol (99:1)  $R_f$  = 45 bzw. 62.

*Dank*—Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Landesamt für Forschung (NRW) danke ich für die Gewährung von Sachmitteln, Herrn Dr. K.-W. Glombitzka für die Überlassung einiger Algen und Frau I. Lachmann für ihre Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

<sup>20</sup> E. STEIN V. KAMIENSKI, *Planta* 50, 291 (1957).

<sup>21</sup> T. HARTMANN, *Planta* 65, 315 (1965).

*Key Word Index*—Rhodophyta; L-leucine carboxylase; amino acid decarboxylase.