

L-ALANINE DECARBOXYLASE IN *CAMELLIA SINENSIS*

TADAKAZU TAKEO

National Tea Research Institute, Kanaya-cho, Haibara-gun, Shizuoka-ken, Japan

(Received 11 July 1977)

Key Word Index—*Camellia sinensis*; Theaceae; tea; alanine decarboxylase; ethylamine; theanine.

Abstract—L-Alanine decarboxylase, extracted from the cotyledon and root of tea seedling, had a pH optimum of 6.25. Pyridoxal-5-phosphate did not activate the enzyme. The enzyme was partially stabilized by L-alanine. Enzyme activity in green seedlings was higher than in etiolated seedlings.

INTRODUCTION

The author has earlier suggested that the ethylamine moiety in theanine (*N*⁵-ethyl-L-glutamine), which is the major amide in the tea plant, might be produced from L-alanine by decarboxylation [1]. The amino acid decarboxylase which forms ethylamine has been recognized in cucumber seedlings [2] and *Ecballium elaterium* [3]. Also decarboxylation and transamination systems forming ethylamine have been reported in *Zea mays* [4].

This paper deals with L-alanine decarboxylase activity in the cotyledon and root of tea seedlings.

RESULTS AND DISCUSSION

Properties of the enzyme

The enzyme produced ethylamine and CO₂ from L-alanine. The amounts of ethylamine-[¹⁴C] released from L-alanine-[U-¹⁴C] was linear for the first hour in the reaction period and was related to the amount of the enzyme. The same results were obtained on estimating the ¹⁴CO₂ formed from L-alanine-[U-¹⁴C].

The pH optimum of the enzyme was ca 6.25 and activity was half maximal at pH 5.5 and 6.5.

L-Alanine decarboxylase activity in tea seedlings was not accelerated by adding pyridoxal-5-phosphate in the reaction mixture and the amounts of ethylamine-[¹⁴C] released from L-alanine-[U-¹⁴C] gave about the same values with and without pyridoxal-5-phosphate. Pyridoxal-5-phosphate, if present, might therefore be strongly bound to the enzyme.

Stability of enzyme activity

When the acetone powder was kept at 0°, its activity was maintained for at least one month with little loss. The enzyme activity in the extract was very labile even when stored at 0° and went down to about 30% of the initial level after standing for 24 hr at 0°.

The stability of the enzyme was not preserved in the buffer solution on adding 20 mM mercaptoethanol or other reducing reagents, such as dithiothreitol or cysteine. However, the enzyme was partially stabilized in the presence of L-alanine and maintained the same activity for 24 hr and about 70% of the initial value after 48 hr. In the reaction mixture, inactivation of the enzyme was detected after 3 hr incubation.

Enzyme activity in tea seedlings

Enzyme activity in cotyledons of tea seedlings cultured for 5 days after germination (110000 cpm/g of Me₂CO powder) was about 3 times higher than that of seedlings cultured for 60 days (40 200 cpm/g).

The enzyme activity in roots of tea seedlings, based on the weight of acetone powder, was rather lower than that in the cotyledons. However, it was noted that the enzyme activity in the developed roots of green seedlings (6300 cpm/g of Me₂CO powder) was about 4 times higher than that in the white and undeveloped roots of etiolated seedlings (1500 cpm/g). This result coincided with the previous result that the incorporation of ¹⁴C into the ethylamine moiety in theanine from L-alanine-[U-¹⁴C] fed to roots of cotyledon-free seedlings was higher in green seedlings than in etiolated seedlings [1].

EXPERIMENTAL

Labelled amino acid. L-Alanine-[U-¹⁴C] (130 mCi/μmol) was obtained from New England Nuclear.

Tea seedlings. Tea seeds sterilized in 0.05% soln of mercury ethiphosphate were washed in H₂O, soaked for 18 hr and germinated in a moist sand bed for 30 days in the dark at 26–28°. 30-day-old seedlings were grown in a greenhouse (green seedlings) or in the dark (etiolated seedlings) for 30 days.

Enzyme preparation. Cotyledons and roots of green and etiolated seedlings were separated and homogenized in cold Me₂CO. The Me₂CO powder was kept in a freezer. The enzyme was extracted from the Me₂CO powder by using 0.05 M K₂HPO₄ and 0.025 M citrate buffer, pH 6.1.

Enzyme assays. Ethylamine assay was carried out in duplicate using a Conway apparatus. The total vol. of reaction mixture was 1.5 ml including 10 μg pyridoxal-5-phosphate, 100 μg L-alanine containing 0.2 μCi L-alanine-[U-¹⁴C] and enzyme extract in above mentioned buffer. The mixtures were incubated for 60 min at 35° and the reactions were terminated by adding 1 ml of M-NaOH to release ethylamine from the mixtures. Ethylamine-[¹⁴C] derived from L-alanine-[U-¹⁴C] was trapped in 1 ml of M-HCl in the center well. The HCl soln was transferred to a vial and counted by liquid scintillation using 10 ml of a dioxan based scintillator soln (4 g PPO, 0.2 g POPOP, 60 g naphthalene, 100 ml MeOH, and 20 ml ethylene glycol in 1 l. dioxan). CO₂ assay was carried out using a Warburg apparatus but using the above reaction mixture. After incubation for 60 min at 35°, the reaction stopped by adding 1 ml of M-HCl and ¹⁴CO₂ derived from the carboxyl moiety of L-alanine was trapped in 0.2 ml of M-KOH in the center well. The KOH soln was transferred to a vial and ¹⁴CO₂ activity was counted.

REFERENCES

1. Takao, T. (1974) *Phytochemistry* **13**, 1401
2. Dunnill, P. M. and Fowden, L. (1963) *J. Exp. Botany* **14**, 237.
3. Crocorno, O. J. and Fowden, L. (1970) *Phytochemistry* **9**, 537.
4. Von Preusser, E. (1975) *Biol. Zb. L'vov'sk Derzh. Univ.* **94**, 75.

Phytochemistry, 1978, Vol 17, pp 314-315 Pergamon Press Printed in England

DIE CYANOGENEN VERBINDUNGEN VON *HETERODENDRON OLEAEFOLIUM*

ADOLF NAHRSTEDT und WINFRIED HÜBEL

Institut für Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität, D-3300 Braunschweig, Deutschland

(Received 16 August 1977)

Key Word Index—*Heterodendron oleaeifolium*; Sapindaceae; cyanolipids, cyanogenic glucoside; configuration; 2- β -D-glucopyranosyloxy-3-methyl-butyronitrile.

Kürzlich berichteten wir über das Vorkommen eines neuen cyanogenen Glykosides (2- β -D-glucopyranosyloxy-3-methylbutyronitril, **1**) in den vegetativen Teilen der Sapindacee *Heterodendron oleaeifolium* Desf. [1]; eine Verbindung gleicher Struktur wurde in der Mimosacee *Acacia sieberiana* gefunden [2]. Die Konfiguration am Asymmetriezentrum C-2 im Aglykon von **1** blieb offen. Darüberhinaus enthält *H. oleaeifolium* in den Samen der reifen Früchte in Übereinstimmung mit vielen anderen Sapindaceen [3] ein cyanogenes Öl, dessen Zusammensetzung unbekannt war. Über die Klärung der Konfiguration von **1** sowie die cyanogenen Sameninhaltsstoffe von *H. oleaeifolium* wird im folgenden berichtet.

1 läßt sich in rauchender HCl unter Erhalt der Konfiguration am C-2 [4] zu 2-Hydroxy-isovaleriansäure (**2**) hydrolysieren. Veresterung von **2** mit (–) Menthol und anschließender GLC des (–) Menthylesters von **2** an FFAP im Vergleich zu (–) Menthylestern eines käuflichen Enantiomerengemisches von 2-Hydroxyisovaleriansäure zeigte, daß **2** optisch rein vorlag. 2-(–) Menthylester war mit demjenigen Diastereomeren mit kürzerer Retentionszeit des veresterten Enantiomerengemisches identisch. (S)-2-Hydroxy-isovaleriansäure ist aus L-Valin unter Erhalt der Konfiguration am C-2 über Diazotierung und anschließende Verkochung in guter Ausbeute zugänglich [5, 6]. Der (–) Menthylester derartig dargestellter (S)-2-Hydroxy-isovaleriansäure ist GLC identisch mit demjenigen aus **2**, dem damit ebenfalls (S)-Konfiguration am C-2 zukommt. Daraus folgt, daß auch **1** (S)-Konfiguration am C-2 besitzt. **1** ist demnach 2- β -D-glucopyranosyloxy-3-methyl-(2S)-butyronitril. Im Gegensatz zu der bei [7] auf Grund vergleichender ¹H-NMR-Daten geäußerten Ansicht nehmen wir aus biogenetischen Gründen an, daß auch dem zweiten aus *H. oleaeifolium* isolierten [1], ebenfalls biogenetisch aus Leucin ableitbaren Cyanoglucosid 2- β -D-glucopyranosyloxy-3-methylen-4-hydroxy-butyronitril (Cardiospermin) [8] (S)-Konfiguration im Aglykon zukommt. Über die Konfigurationsklärung von Acacipetalin [9] und Dihydroacacipetalin [2] aus Mimosaceen berichten wir an anderer Stelle.

Tabelle 1 Prozentualer Anteil der Fettsäuren in den Fraktionen A–C sowie der Gesamtcyanolipid-Fraktion

Fraktion	% Anteil im Gesamtcyanolipid	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{20:0}	C _{20:1}
Gesamtcyanolipide		3.6	1	42.7	1	15.0	38.5
A	50.9	4.0	1	48.2	1.7	1.3	44.1
B	43.6	2.9	1	35.3	1	29.4	32.4
C	5.5	5.7	3.8	41.5	—	20.8	28.3

Die reifen Samen von *H. oleaeifolium* enthalten ca 42% eines fetten Öles, das nach saurer und alkalischer Hydrolyse HCN freisetzt; das entfettete Samenschrot ist dagegen nicht cyanogen. Das durch Petroläther-Extraktion gewonnene Öl wurde im wesentlichen nach [10, 11] analytisch bearbeitet. Das Fehlen einer Nitrilbande im IR-Spektrum des Gesamtöles belegt die Abwesenheit acyanogener Cyanolipid-Typen [11]. Die quantitative Auswertung des ¹H-NMR-Spektrums des Gesamtöles ergab einen Anteil von 30% Cyanolipiden im Samenöl. Die Cyanolipidfraktion wurde durch präparative DC an Kieselgel sowie HPLC an einer C-18-Säule von den Glyceriden abgetrennt. Das ¹H-NMR-Spektrum dieser Fraktion ist mit demjenigen einer *Allophylus* spec. [12] dargestellt in [10] identisch und belegt als einzigen Cyanolipid-Typ den Fettsäurediester eines 2,4-Dihydroxy-3-methylenbutyronitrils (Typ II nach 11). Die Gesamtcyanolipide wurden durch HPLC an einer C-18-Säule mit Acetonitril–MeOH-Gemischen in drei Fraktionen zerlegt (A, B, C). Alkalische Hydrolyse der Gesamtcyanolipide als auch der Cyanolipidfraktionen A–C und GLC der erhaltenen Fettsäuren als Methylester an FFAP führten zu den in Tabelle 1 dargestellten Ergebnissen. Sie zeigen, daß auch nach Auftrennung in dem verwendeten HPLC-System keine einheitlichen Cyanolipide vorliegen. Es lassen sich vornehmlich drei Diester-Typen mit C_{18:1}/C_{20:1}-, C_{18:1}/C_{20:0}- und C_{20:1}/C_{20:1}-Fettsäureresten konstruieren, deren Substitutionsverteilung am C-2- bzw. C-4-Hydroxyl der Alkoholkomponente jedoch offen bleibt. Mit den vorgelegten Daten befindet sich *H. oleaeifolium* im Übereinstimmung mit etlichen weiteren