

KARL-OSKAR MOSEBACH und WILHELM DIRSCHERL  
 DIE WIRKUNGSWEISE EINIGER EFFEKTOREN  
 DER D-AMINOSÄUREOXYDASE, II<sup>1)</sup>

Das Verhalten der Katalase

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Bonn  
 (Eingegangen am 31. Januar 1957)

*Herrn Professor B. Helferich zum 70. Geburtstag gewidmet*

Kristallisierte Rinderleberkatalase vermag gleich vielen Aminosäuren und verwandten Effektoren die D-Aminosäureoxydase vor Inaktivierungen durch Schwermetallionen, naszierendem Hydroperoxyd, Wärme usw. zu schützen, doch können diese Effekte nicht als einfache Protektorwirkungen aufgefaßt werden. Die Anfangsgeschwindigkeit wird durch die genannten Stoffe nicht nur aufrecht erhalten, sondern zum Teil erheblich gesteigert, insbesondere bei gleichzeitiger Zugabe von Katalase und L-Aminosäure. Die Kinetik dieser Effekte ähnelt der cyclischen Oxydation, die D. KEILIN und E. F. HARTREE<sup>2)</sup> bei der Xanthinoxidase fanden. Bei der Histaminase wurde kein derartiger Effekt beobachtet.

Bei der zuerst von S. EDLBACHER und O. WISS<sup>3)</sup> studierten Einwirkung von Aminosäuren und anderen Effektoren auf die D-Aminosäureoxydasereaktion treten Aktivierungen und Hemmungen auf, deren Kinetik in der I. Mitteilung<sup>1)</sup> näher untersucht worden ist. Dabei war besonders auffallend die Streckung der Zeit-Umsatzkurve und die Tatsache, daß schon die Anfangsgeschwindigkeit durch derartige Effektoren erheblich beeinflußt werden kann. Bei dem Versuch, diese Effektoren als Protektoren gegenüber Schwermetallionen, oxydativen Schädigungen, thermischen Inaktivierungen usw. aufzufassen, stößt man auf Widersprüche, auf die zum Teil in der I. Mitteilung eingegangen wurde. Abgesehen von der Tatsache, daß nicht nur Aktivierungen, sondern auch Hemmungen auftreten, muß man zumindest annehmen, daß diese Effektoren vor verschiedenen Schädigungen gleichzeitig schützen können. Aber selbst, wenn man ihnen eine solch mannigfaltige Wirkung zuerkennt, sprechen andere Befunde gegen eine Auffassung dieser Effekte als einfacher Protektorwirkungen. Aufschlußreich ist ein Vergleich verschiedenartiger Effektoren, von denen die einen (Histidin und andere Aminosäuren, Äthylendiamintetraacetat) als Protektoren gegenüber schädigenden Schwermetallionen, die anderen (Katalase, Peroxydase) als Protektoren gegenüber oxydativen Schädigungen angesehen werden. Man kann mit Vertretern beider Gruppen *in vitro* praktisch lineare Zeit-Umsatzkurven erhalten, während sie ohne Zusätze meist mehr oder weniger gekrümmt verlaufen (Abbild. 1. Kurve I → II; Abbild. 2. Kurve I → II bzw. I → III).

Wäre Katalase beispielsweise nur Protektor gegenüber naszierendem Hydroperoxyd, dürfte keine lineare Umsatzkurve mit diesem Effektor erreicht werden, weil noch

<sup>1)</sup> I. Mitteil.: W. DIRSCHERL und K.-O. MOSEBACH, Liebigs Ann. Chem. **604**, 75 [1957].

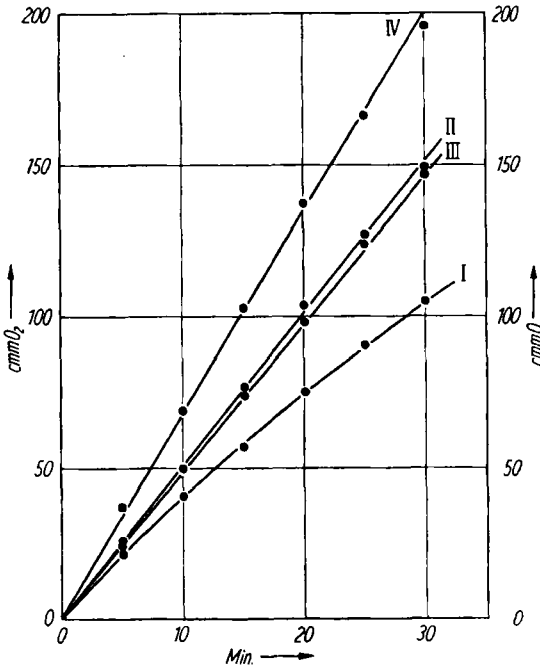
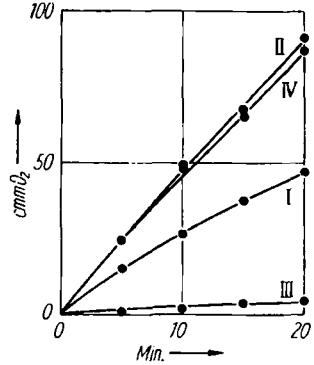
<sup>2)</sup> Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B **119**, 141 [1936].

<sup>3)</sup> Helv. chim. Acta **28**, 797, 1111 [1945]; **29**, 162 [1946].

Schädigungen durch immer vorhandene Schwermetallionen usw. stattfinden. Umgekehrt dürfte man durch L-Aminosäuren und Äthylendiamintetraacetat keinen linearen Kurvenverlauf bekommen, wenn diese Effektoren nicht gleichzeitig auch vor oxydativen Schädigungen schützten.

Abbild. 1. Einfluß von L-Histidin und Cu<sup>II</sup>-Ionen auf die D-Aminosäureoxydase

37°; m/15 Phosphatpuffer, p<sub>H</sub> 7.2; m/100 D-Alanin; 1 µg FAD\*-Barium; 100 µg Apoferment; Gesamtvolumen 2 ccm; Messung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs manometrisch (Luft). I. ohne Zusatz; II. 3.1 mg L-Histidin; III. 12 µg Cu(II)-sulfat; IV. 3.1 mg L-Histidin + 12 µg Cu(II)-sulfat (nach Histidin zugegeben).



Abbild. 2. Einfluß von L-Alanin und Katalase auf die D-Aminosäureoxydase

37°; m/15 Phosphatpuffer, p<sub>H</sub> 7.2; m/100 D-Alanin; 1.5 µg FAD-Barium; 150 µg Apoferment; Gesamtvolumen 2 ccm; Messung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs manometrisch (Luft). I. ohne Zusatz; II. 1.8 mg L-Alanin; III. 10 µg Katalase; IV. 1.8 mg L-Alanin + 10 µg Katalase. Für die Kurven III und IV (mit Katalase) gilt die Ordinate cmm O.

\*) Hier und im folgenden: FAD=Flavinadenin-dinucleotid.

## INAKTIVIERUNG DER D-AMINOSÄUREOXYDASE DURCH SCHWERMETALLIONEN

Wie die meisten Fermente wird auch die D-Aminosäureoxydase durch eine Reihe von Schwermetallionen gehemmt.  $\text{Cu}^{\text{II}}$ - und  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Ionen dürften praktisch hierbei die größte Bedeutung haben. Die Tabelle enthält die Inaktivierungen in % unter gleichen Bedingungen.

*Einfluß von Schwermetallionen auf die Aktivität von D-Aminosäureoxydase*

37°; *m*/15-Phosphatpuffer,  $p_{\text{H}}$  7.2; *m*/100 D-Alanin; 1 $\mu\text{g}$  FAD-Barium; 100 $\mu\text{g}$  Apoferment; 6 $\mu\text{g}$  Metallionen; Gesamtvolumen 2ccm; Messung des  $\text{O}_2$ -Verbrauchs manometrisch (Luft); Werte nach 15 Min.

Zusatz	cmm $\text{O}_2$	Effekt %	Zusatz	cmm $\text{O}_2$	Effekt %
—	51.5	—	—	57.0	—
$\text{CuSO}_4$	0	— 100	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	53.0	— 7
$\text{ZnSO}_4$	52.0	0	$\text{NiSO}_4$	50.0	— 12
$\text{CdSO}_4$	4.0	— 92	$\text{CoSO}_4$	52.0	— 9
$\text{HgCl}_2$	2.5	— 95	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$	42.0	— 26
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	57.5	+ 12	$\text{Fe}_2(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_4$	48.0	— 16

Die Ergebnisse ähneln denen, die H. A. KREBS<sup>4)</sup> bei einer entsprechenden Untersuchung mit Papain erhielt. Auffallend ist jedoch das Fehlen eines Zinkeffekts bei der D-Aminosäureoxydase. Krebs, der mit Carbonatpuffer arbeitete, beobachtete eine sehr starke Hemmung der Papainaktivität durch Zinkionen, die er spezifisch durch Pyrophosphat, nicht jedoch durch Orthophosphat aufheben konnte. Das Fehlen eines Zinkeffekts bei unseren Versuchen läßt sich also nicht auf die Verwendung von Phosphatpuffer an Stelle von Carbonatpuffer zurückführen. Der kleine positive Effekt mit Bleinitrat ist reproduzierbar. Da er jedoch mit Bleiacetat nicht erhalten werden kann, läßt sich die Aktivierung auf die Nitrationen zurückführen. Setzt man vor den Schwermetallionen Histidin zu, also einen ausgezeichneten Komplexbildner, unterbleiben die Inaktivierungen (Abbild. 1), nicht aber, wenn man umgekehrt verfährt.

Aus diesem Ergebnis würde man in Unkenntnis des gesamten Erscheinungskomplexes ausschließlich auf eine Protektorwirkung gegenüber schädigenden Schwermetallionen schließen.

Krebs stellte fest, daß die Schwermetallionen locker am Ferment haften, ihre Konzentration im Fermentpräparat also proportional der verwendeten Fermentmenge sein muß. Wenn der Grund der Aktivierung durch Histidin lediglich in einer Beseitigung störender Schwermetallionen läge, wäre nicht einzusehen, warum bei zunehmender Fermentkonzentration diese Aktivierungen nicht nur verschwinden, sondern sogar in Hemmungen übergehen können<sup>1,3)</sup>, selbst wenn die Histidinkonzentration im gleichen Maße ansteigt.

## INAKTIVIERUNG DURCH NASCIERENDES HYDROPEROXYD

Bei Zugabe einiger  $\mu\text{g}$  kristallisierter Rinderleberkatalase kann man ebenfalls eine Streckung der Zeit-Umsatzkurve bis zur Linearität beobachten (Abbild. 2, Kurve I  $\rightarrow$  III).

Hätte man nur Versuche mit Effektoren, die naszierendes Hydroperoxyd unschädlich machen, durchgeführt, würde man diesen Katalaseeffekt lediglich für eine Pro-

<sup>4)</sup> Biochem. Z. 220, 289 [1930].

tektorwirkung gegenüber naszierendem Hydroperoxyd halten. Setzt man voraus, daß das Ferment gleichzeitig von Schwermetallionen und naszierendem Hydroperoxyd angegriffen wird, ist nicht einzusehen, wieso jeweils schon *ein* Protektortyp einen vollkommenen Schutz gegenüber beiden Schädigungen ausüben kann. Man beachte dabei, daß im einen Fall mit mg-Konzentrationen an Aminosäuren, im anderen mit µg-Konzentrationen an Katalase gearbeitet wurde. Die Auffassung von EDLBACHER und WISS<sup>3)</sup>, daß der Histidingehalt der Katalase für deren Aktivatoreneigenschaft verantwortlich sei, kann in diesem Umfange nicht stimmen. Erstens genügt eine der Katalasemenge entsprechende Histidinmenge nicht, um auch nur annähernd die Wirkung der Katalase zu erzielen, und zweitens gibt es einige bemerkenswerte kinetische Unterschiede zum Histidineffekt, wie in einem späteren Abschnitt gezeigt wird. EDLBACHER und WISS haben mit einem rohen Katalasepräparat gearbeitet, so daß ihre Aktivierungen nicht als reine Katalasewirkung angesehen werden können.

#### GEMEINSAME EINWIRKUNG VON L-AMINOSÄUREN UND KATALASE AUF DIE D-AMINOSÄUREOXYDASE

Im Hinblick auf diesen Sachverhalt ist die Frage interessant, wie sich eine gemeinsame Einwirkung von L-Aminosäuren und Katalase auswirkt.

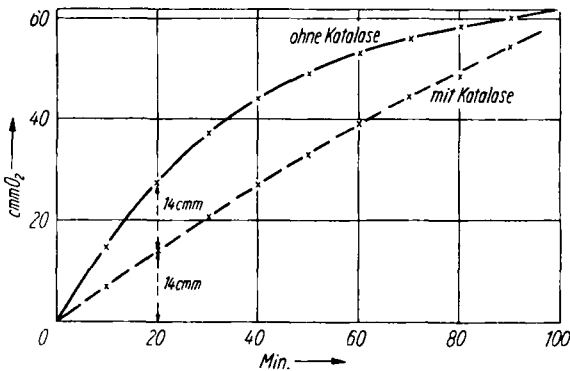
Im folgenden Versuch (Abbild. 2, Kurven I bis IV) wurden Konzentrationen an L-Aminosäure (L-Alanin) und Katalase gewählt, bei denen praktisch gleiche Umsatzkurven mit jedem Effektor allein, und zwar lineare im Unterschied zur Kurve ohne Zusätze, erzielt wurden. Beide Effektoren müßten also während der Versuchszeit jeder für sich einen genügenden Schutz vor den verschiedenen Schädigungsarten ausgeübt haben. Bei Einsatz beider Effektoren gemeinsam (Kurve IV) trat dazu noch eine beträchtliche Aktivierung der Anfangsgeschwindigkeit auf. *In Gegenwart von Katalase aktiviert die L-Aminosäure also stärker als ohne Katalase.* In unserem Beispiel betrug die Aktivierung nach 10 Min. durch L-Alanin ohne Katalase + 25%, L-Alanin mit Katalase + 40%. Entsprechende Ergebnisse erhält man auch bei Kombination von Katalase mit L-Histidin.

#### VERGLEICH DER KATALASEWIRKUNG BEI D-AMINOSÄUREOXYDASE UND HISTAMINASE<sup>\*)</sup>

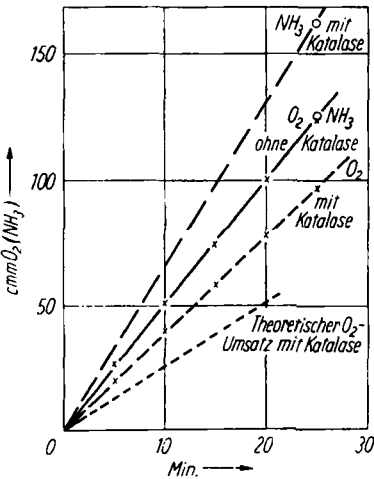
Da über die physiologische Bedeutung der Katalase, insbesondere ihre Rolle bei peroxydatischen Prozessen im Sinne von KEILIN und HARTREE<sup>2)</sup>, bisher so wenig Klarheit herrscht, haben wir das Verhalten der Katalase etwas eingehender studiert. Uns interessierte hierbei vor allem auch ihre Einwirkung auf andere oxydative Desaminierungsreaktionen. Es stellte sich nämlich beim Vergleich der D-Aminosäureoxydase mit der Histaminase heraus, daß gewisse Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit des naszierenden Hydroperoxyds bei beiden Systemen bestehen. Die D-Aminosäureoxydase wird zum Unterschied von der Histaminase sehr stark beeinflußt, teils gehemmt, teils aktiviert, durch Stoffe, die mit diesem naszierenden Hydroperoxyd energisch reagieren und daher als Nachweisreagenzien in Frage kommen, wie Indigocarmin und Cer(III)-hydroxyd. (Auf diese Zusammenhänge wird in einer späteren Arbeit eingegangen werden.) Auch bei der Einwirkung von 1 µg krist. Rinderleberkatalase auf die

<sup>\*)</sup> Der Inhalt dieses Abschnittes wurde von einem von uns (MOSEBACH) am 27. 9. 1956 auf der Tagung der Ges. für Physiolog. Chemie in Hamburg vorgetragen.

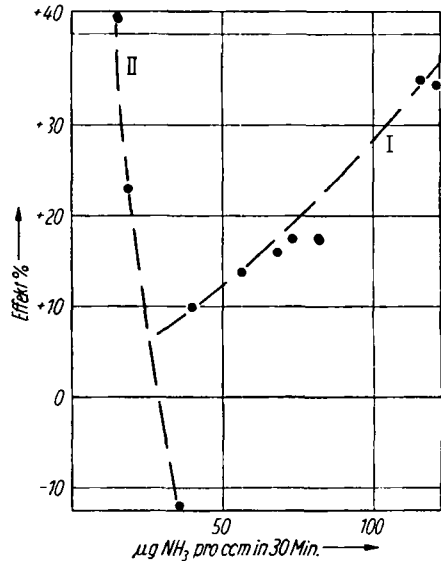
beiden hochgereinigten, katalasefreien Fermente ließ sich ein charakteristischer Unterschied erkennen. Bei der Histaminasereaktion wird der  $O_2$ -Verbrauch zu Beginn der Reaktion exakt auf die Hälfte herabgesetzt (Abbild. 3): in Abwesenheit von Ka-



Abbild. 3. Abbau von Cadaverin-dihydrochlorid durch Histaminase ohne und mit Katalase ( $1 \mu g$ )  $37^\circ$ ;  $m/30$  Phosphatpuffer,  $pH$  7.2; 1 mg Cadaverin-dihydrochlorid;  $585 \mu g$  Histaminase; Gesamtvolumen 3 ccm; Messung des  $O_2$ -Verbrauchs manometrisch (Luft).

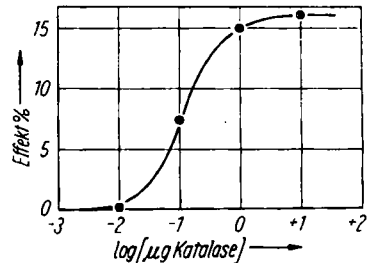


Abbild. 4. Abbau von D-Alanin durch die D-Aminosäureoxydase ohne und mit Katalase ( $1 \mu g$ )  $37^\circ$ ;  $m/30$  Pyrophosphatpuffer,  $pH$  7.0;  $m/50$  D-Alanin;  $2 \mu g$  FAD-Barium;  $75 \mu g$  Apoferment; Gesamtvolumen 2 ccm; Messung des  $O_2$ -Verbrauchs manometrisch und der  $NH_3$ -Entwicklung durch Mikrodifusion (Luft).



Abbild. 5. Abhängigkeit der Katalaseaktivierung der D-Aminosäureoxydasereaktion von der Umsetzungsgeschwindigkeit. I.  $37^\circ$ ;  $m/15$  Phosphatpuffer,  $pH$  8.3;  $m/25$  D-Alanin;  $1 \mu g$  Katalase; 0.3 bis  $1 \mu g$  FAD-Barium; 77 bis  $230 \mu g$  Apoferment; Gesamtvolumen 3 ccm; Messung der  $NH_3$ -Entwicklung durch Mikrodifusion (Luft). II. Diese Kurve stellt im Vergleich hierzu den Einfluß von  $m/40$  L-Leucin auf die D-Aminosäureoxydasereaktion dar (Teilkurve).

talase wird 1 Mol.  $O_2$  zur Oxydation von 1 Mol. Substrat gebraucht, in Gegenwart von Katalase dagegen nur  $\frac{1}{2}$  Mol.  $O_2$  für den gleichen Umsatz. Diese ökonomischere Ausnutzung des Sauerstoffs steht im Einklang mit der Ökonomisierungstheorie von T. THUNBERG<sup>5)</sup>. Außerdem wird entsprechend der Protektortheorie von H. WIELAND<sup>6)</sup> das Ferment wegen der Zersetzung des schädlichen Hydroperoxyds geschützt, was den gradlinigen Verlauf der Umsatzkurve mit Katalase zur Folge hat. Anders liegen die Verhältnisse bei der D-Aminosäureoxydase (Abbild. 4). Hier wird der  $O_2$ -Verbrauch durch Katalase nicht auf die Hälfte, sondern um einen geringeren Betrag herabgesetzt. Die mittlere Kurve stellt den  $O_2$ -Verbrauch und die  $NH_3$ -Entwicklung in Abwesenheit von Katalase dar. Diese beiden Kurven fallen zusammen, ein Beweis für die Abwesenheit von Katalase. Bei Zusatz von  $1 \mu g$  Katalase aber erfolgt mit großer Regelmäßigkeit eine Aufspaltung in zwei Kurven. Die untere zeigt den Sauerstoffverbrauch an. Sie müßte mit der gestrichelten Linie zusammenfallen, wenn der Sauerstoffverbrauch im Sinne von THUNBERG auf die Hälfte herabgesetzt worden wäre. Die obere Kurve gibt die  $NH_3$ -Entwicklung wieder. Man beobachtet also eine deutliche, reproduzierbare Aktivierung der Anfangsgeschwindigkeit durch Katalase. Die Kinetik dieses Katalaseeffektes weicht in zwei Punkten von der Kinetik bei Verwendung von L-Aminosäuren als Effektoren ab. 1. Die Aktivierungen nehmen mit zunehmender Umsetzungsgeschwindigkeit zu (Abbild. 5), während sie bei den anderen Effektoren



Abbild. 6. Abhängigkeit der Katalaseaktivierung der D-Aminosäureoxydasereaktion von der Katalasekonzentration.  $37^\circ$ ;  $m/15$  Phosphatpuffer,  $pH$  8.3;  $m/25$  D-Alanin;  $1 \mu g$  FAD-Barium;  $150 \mu g$  Apoferment; Gesamtvolumen 2 ccm; Messung der  $NH_3$ -Entwicklung durch Mikrodifusion (Luft).

abnehmen<sup>3)</sup>. 2. Die Aktivierungen beginnen und erreichen ihr Maximum im Unterschied zu den Aminosäureeffekten in einem wesentlich engeren Konzentrationsbereich (Abbild. 6). Es soll noch betont werden, daß trotz vielseitiger Variation der Versuchsbedingungen nie Hemmungen beobachtet wurden.

Diese Beobachtungen, die bei kombiniertem Zusatz von L-Aminosäure und Katalase und bei Zusatz von Katalase allein bei der D-Aminosäureoxydase gemacht wurden, sind nicht vereinbar mit der Annahme einer einfachen Protektorwirkung im Sinne WIELANDS. Bei einer einfachen Protektorwirkung gegenüber naszierendem Hydroperoxyd müßten anfangs gleiche Reaktionsgeschwindigkeiten mit und ohne Protektor vorliegen, weil das schädigende Agens sich erst einmal entwickeln muß. Das kinetische Bild ähnelt vielmehr der cyclischen Oxydation, die KEILIN und HARTREE<sup>2)</sup> beobachteten, als sie Acetaldehyd mit Xanthinoxidase oxydierten und dabei Äthylalkohol und Katalase zusetzten. Hierbei wurde das naszierende Hydroperoxyd durch die Katalase peroxydatisch auf den Äthylalkohol gelenkt, wobei weiterer Acetal-

<sup>5)</sup> Skand. Arch. Physiol (D) 35, 163 [1918]; Naturwissenschaften 10, 417 [1922].

<sup>6)</sup> Ergebn. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmakol. 20, 477 [1922].

dehyd und damit eine Erhöhung der Substratkonzentration auftrat. Auch diese Erhöhung der Substratkonzentration hatte eine bedeutende Aktivierung der Anfangsgeschwindigkeit zur Folge. In Analogie hierzu nehmen wir an, daß bei unseren Versuchen das nascierende Hydroperoxyd durch die Katalase peroxydatisch auf freie und proteingebundene Aminosäuren übertragen wird, wobei diese zwar nicht abgebaut, wohl aber für den fermentativen Abbau in noch unbekannter Weise aktiviert werden. Die Streckung der Umsatzkurve durch die behandelten Effektoren, auch die Katalase, kann als Folge nicht nur eines Fermentschutzes sondern auch einer kombinierten Substrat- und Fermentaktivierung angesehen werden, indem mit zunehmender Effektoenkonzentration ein zunehmender Bruchteil des Substrats der Fermentreaktion zugänglich gemacht wird. Dies wurde früher<sup>1)</sup> ausführlich dargestellt. Wir vermuten, daß das nascierende Hydroperoxyd durch die Katalase zu einer allgemeinen Erhöhung der Reaktionsfähigkeit des Systems ausgenutzt wird. Man darf also im Hydroperoxyd nicht einfach ein Zellgift sehen, sondern muß annehmen, wie in späteren Versuchen noch weiter gezeigt werden wird, daß es bei Gegenwart geeigneter Synergisten eine hervorragende Rolle als Aktivator bei physiologisch-chemischen Prozessen spielt. Die Befunde, daß bei unseren Versuchen nicht nur das kombinierte System Katalase-L-Aminosäure, sondern auch die Katalase allein zu Aktivierungen befähigt ist, ergänzen sich. Die Katalase vermag anscheinend nicht nur mit zugesetzten Aminosäureeffektoren, sondern auch schon mit den vorhandenen freien und gebundenen Aminosäuren (Substrat, Ferment) zusammenzuwirken. Für die Beantwortung der Frage, was man sich unter aktivierten Aminosäuren vorzustellen hat, gibt es Anhaltspunkte. Bei der Einwirkung von  $\gamma$ -Strahlen auf wäßrige Lösungen von Aminosäuren, bei der die gemeinsamen Radikale von Wasser und Wasserstoffperoxyd entstehen, sicher also auch das, was man unter nascierendem Wasserstoffperoxyd versteht, treten wahrscheinlich Aminosäureradikale<sup>7)</sup> auf, die in der Lage sind, mit anderen Stoffen energisch weiter zu reagieren. Auf den Nachweis, die Entwicklung und Reaktionsfähigkeit des nascierenden Hydroperoxyds in den behandelten Systemen werden wir in der nächsten Mitteilung ausführlich eingehen.

Fragt man, warum auch Aminosäuren ohne Katalasezusatz vor nascierendem Hydroperoxyd schützen (Erzielung linearer Umsatzkurven) und darüber hinaus die Anfangsgeschwindigkeit aktivieren können, so kann man zunächst einmal auf die Arbeiten von H. MIX, W. TITTELBACH-HELMRICH und W. LANGENBECK<sup>8)</sup> hinweisen, aus denen hervorgeht, daß Komplexe aus Aminosäuren und Schwermetallen (insbesondere Cu und Fe) Katalasewirkung besitzen. Man muß damit rechnen, daß auch in gereinigten Fermentpräparaten genügend Schwermetallionen vorhanden sind, um mit zugesetzten oder auch vorhandenen Aminosäuren derartige „Pseudokatalasen“ zu bilden. Die Frage, warum umgekehrt Katalase auch vor anderen Schädigungen schützen kann, läßt sich nicht so leicht beantworten, doch sprechen alle unsere Versuche dafür, daß die verschiedenen Schädigungsarten, ihre Überwindung durch geeignete Effektoren oder, allgemeiner gesagt, die meisten hier behandelten Aktivierungen und Hemmungen einem umfassenderen Reaktionsschema angehören.

7) G. STEIN, J. Chim. physique **52**, 638 [1955].

8) Chem. Ber. **89**, 69 [1956].

### Methodik

*Fermentpräparate:* Das Apoferment der D-Aminosäureoxydase wurde nach E. NEGELEIN und H. BRÖMEL<sup>9)</sup> bereitet. Wir begnügten uns mit dem fünften Schritt, da der sechste keine wesentliche Aktivitätssteigerung herbeiführt und ein instabiles Produkt ergibt. Außerdem verwendeten wir an Stelle der schwer zugänglichen Hammelnieren Schweinenieren, die überdies zu einer größeren Ausbeute führen. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe der Biuretmethode<sup>10)</sup> bestimmt. Das gereinigte Präparat besitzt lediglich bei 280m $\mu$  ein Maximum, der Extinktionskoeffizient beträgt etwa  $1.5 \cdot l \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ . Das Bariumsulfat des Flavinadeninucleotids (als Coferment der D-Aminosäureoxydase) wurde nach O. WARBURG und W. CHRISTIAN<sup>11)</sup> hergestellt. Für Konzentrationsbestimmungen wurde das Maximum bei 450m $\mu$  mit einem Extinktionskoeffizienten von  $1.13 \cdot 10^{-7} qcm/Mol$  (oxydierte Form) eingestellt. Ein Teil des Coferments erwies sich entsprechend den Angaben von NEGELEIN und BRÖMEL im optischen Test unwirksam. Wahrscheinlich tritt bei der Aufarbeitung der Hefe eine weitere Esterbindung zwischen dem Ribitylalkohol und der angrenzenden Phosphatgruppe auf, die zur Inaktivierung führt<sup>12)</sup>.

Gereinigte Histaminase, ebenfalls aus Schweinenierenrinde, erhielten wir gemäß R. KAPPELLER-ADLER<sup>13)</sup> mit Hilfe fraktionierter Ammoniumsulfatfällungen und Adsorption an Calciumphosphatgel. Kristallisierte Rinderleberkatalase wurde uns freundlicherweise von der Firma C. F. BOEHRINGER & SÖHNE, Mannheim, zur Verfügung gestellt.

*Versuchsansatz:* Die Messung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs erfolgte manometrisch nach O. WARBURG. Im Einsatz befanden sich bei Versuchen mit D-Aminosäureoxydase 0.05 ccm 20-proz. Kalilauge (Filterpapier), um das bei der Zersetzung der Brenztraubensäure entstehende CO<sub>2</sub> zu binden. Da der O<sub>2</sub>-Verbrauch der oxydativen Desaminierungsreaktionen vom Katalasegehalt der Präparate abhängt, wurden zur Kontrolle und zum Vergleich NH<sub>3</sub>-Bestimmungen nach E. J. CONWAY und E. O'MALLEY<sup>14)</sup> durchgeführt. Mit dieser Methode lassen sich bei Verwendung von  $m/500$  HCl noch  $\mu g$ -Differenzen gut erfassen, wenn nur 1 ccm des Borsäure-Indikatorgemischs vorgelegt und eine absolute NH<sub>3</sub>-Konzentration von 50  $\mu g$  nicht überschritten wird.

Wir danken Fräulein E. BURZLAFF für ihre geschickte Mithilfe.

9) Biochem. Z. 300, 225 [1939].

10) TH. BÜCHER, Arbeitsvorschriften für das Photometer „Eppendorf“ No. 1 [1953].

11) Biochem. Z. 298, 150 [1938].

12) H. R. MAHLER und D. E. GREEN, Science [Washington] 120, 7 [1954].

13) Biochem. J. 44, 70 [1950].

14) Biochem. J. 36, 655 [1942].