

Il semble donc que la méthode de *Rosenmund* et l'emploi d'un régulateur soufré seraient malgré tout indiqués.

Pour isoler l'aldéhyde, on traite les fractions distillant sous 15 mm. entre 100 et 120° avec de la semicarbazide. Après purification dans l'alcool la semicarbazone fond à 172—174°.

$C_{12}H_{21}ON_3$	Calculé C	64,52	H	9,48%
	Trouvé „	64,63	„	9,68%

Il s'agit donc bien de l'aldéhyde non-saturé.

1, 1, 6-Triméthyl-3-(butène-3¹-ylone-3³)-cycloheptène. X.

La semicarbazone ci-dessus est mélangée à la même quantité d'acide oxalique et distillée à la vapeur d'eau. L'aldéhyde récupéré est tout de suite condensé avec de l'acétone à l'aide d'un peu de méthylate de sodium. Le produit de condensation distille dans un vide de 17 mm. entre 157—160°. Pour le purifier, on le transforme en semicarbazone. Après trois cristallisations dans l'alcool, celle-ci fond à 208—209°.

$C_{15}H_{25}ON_3$	Calculé C	68,4	H	9,5	N	16,0%
	Trouvé „	68,35	„	9,80	„	15,64%

L'odeur de la cétone obtenue à partir de cette semicarbazone à l'aide de l'acide oxalique n'a rien de commun avec l'odeur de l'irone. Elle est très fleurie et balsamique, peut-être avec une très légère note de violette.

Genève, Laboratoires de la maison *Firmenich & Cie.*
(Successeur de *Chuit, Naef & Cie.*)

116. Zur Kenntnis der *d*-Aminosäure-dehydrase

von **P. Karrer** und **H. Frank.**

(3. VII. 40.)

Das Lactoflavin-adenin-nucleotid ist von *O. Warburg* und *W. Christian*¹⁾ in annähernd reinem Zustande erhalten und als Coferment verschiedener dehydrierender gelber Enzyme erkannt worden, nachdem dieselbe Substanz in geringerem Reinheitszustand bereits vorher aus Leber in unserem Institut isoliert worden war²⁾.

Wir haben uns erneut mit diesem Lactoflavin-adenin-nucleotid beschäftigt, wobei zur Reinigung das von *Warburg* und *Christian* empfohlene Verfahren mit einer Reihe von Abänderungen Anwendung fand.

¹⁾ Bioch. Z. **298**, 150 (1938).

²⁾ Helv. **20**, 79 (1937) — Verhandlungsberichte des 6. Solvay-Kongresses, S. 49 (1937). Vgl. auch Helv. **21**, 826 (1938).

Die Wirkungsstärke des Präparates ist durch folgenden Oxydationsversuch gekennzeichnet:

Im Hauptgefäß: 8 Tropfen Proteinlösung, 5 γ Lactoflavin-adenin-nucleotid in 2 cm³ 0,05-m. Pyrophosphatpuffer, 6 Tropfen 5-proz. *d, l*-Alaninlösung.
Im Seitenansatz: 5 Tropfen 20-proz. Kalilauge.
Im Gasraum: Sauerstoff.
Nach 10 Minuten Sauerstoffabsorption 51 mm³.

Mit diesem annähernd reinen Präparat haben wir folgende Fragen zu beantworten gesucht.

Zunächst wurde geprüft, ob sich die Aminogruppe der Adenin-Komponente im Lactoflavin-adenin-nucleotid im freien Zustand befindet; dies scheint der Fall zu sein, denn die Substanz entwickelt bei der *van Slyke*-Bestimmung annähernd 1 Mol Stickstoff. Weiterhin haben wir mit dem von uns früher empfohlenen Perjodsäureabbau¹⁾, der die Stellung des Phosphorsäurerestes in phosphorylierten Zuckern zu beurteilen erlaubt, untersucht, ob die beiden Phosphorsäurereste des Lactoflavin-adenin-nucleotids in den beiden Zuckergruppen endständig stehen. Dies trifft für dieses gelbe Coferment zu, da sich beim Jodsäureabbau nur Spuren Formaldehyd bildeten. Das Ergebnis dieser Versuche steht in Übereinstimmung mit der Feststellung von *Abraham*²⁾, wonach es möglich ist, das Lactoflavin-adenin-nucleotid durch alkalische Hydrolyse in Lactoflavinphosphorsäure und Adenylsäure zu spalten, die beide die Phosphorsäuregruppe in den Zuckerresten endständig führen.

Hauptsächlich diente uns das weitgehend gereinigte Lactoflavin-adenin-nucleotid zur Abklärung der Frage, ob die *d*-Aminosäure-dehydrase, die es mit dem spezifischen Protein aus Hammelnieren bildet³⁾, alle natürlichen *d*-Aminosäuren zu desaminieren vermag, oder wie weit die Spezifität reicht.

Schon zu einer Zeit, als man noch mit rohen Trockenpräparaten und Gewebeschnitten arbeitete, zeigte es sich, dass die verschiedenen Aminosäuren der *d*-Reihe nicht mit der gleichen Geschwindigkeit von dem Ferment angegriffen werden. Eine Reihe von Autoren gab zunächst an, dass sich die Extrakte aus Niere und Leber in ihrer Wirksamkeit unterscheiden, und dass diese Wirksamkeit auch mit der Tierart wechsele, aus deren Organen die Extrakte gewonnen waren. So stellte *Bernheim*⁴⁾ fest, dass Extrakte aus Ratten-, Hunde- und Katzenieren mit fast gleicher Wirksamkeit eine Reihe von *d*-Aminosäuren desaminierten, während bei Präparaten aus Leber nur Wirk-

1) *Karrer, Frei, Meerwein*, Helv. **20**, 79 (1937).

2) *E. P. Abraham*, Arkiv. Kemi **13** [B], No. 5 (1938).

3) *Warburg und Christian*, Bioch. Z. **298**, 150 (1938).

4) *F. Bernheim und M. L. Bernheim*, J. Biol. Chem. **109**, 131 (1935).

samkeit auf Prolin festgestellt wurde. *Kisch*¹⁾²⁾, der mit Organpulver-Extrakten arbeitete, fand, dass nur α -Aminosäuren desaminiert werden, und dass die desaminierende Wirkungsstärke des Ferments vom Glycin zur Aminobuttersäure mit der Länge der C-Kette zunimmt. In manchen Fällen sank die Ammoniak-Ausbeute, wenn die α -Aminosäure ausser der Aminogruppe eine andere funktionelle Gruppe enthielt (z. B. Alanin-Serin). Auch Ersatz eines H-Atoms durch die CH_3 -Gruppe am β -ständigen C-Atom hemmte. Eine Verlängerung der Kette durch $-\text{CH}_2$ -Gruppen vor oder hinter der Verzweigungsstelle (z. B. Valin-Leucin) erhöht die Desaminierbarkeit. *Kisch* stellte weiter fest, dass die Organextrakte verschiedener Tierarten verschiedenes Verhalten zeigen, und dass bei der gleichen Tierart Extrakte aus Leber wesentlich schwächer wirksam waren als solche aus Niere. Er unterschied daher drei Amidasen-Typen: Typ A, aus Schweine- und Schaforganen, zeigt Abhängigkeit der Wirkung von der Länge der Kohlenstoffkette der Aminosäure; je länger die Kette, desto besser die Desaminierung. Eine endständige OH-Gruppe oder eine Verzweigung der Kette verursacht starke Hemmung. Typ B, aus Organen von Katze, Hund, Meer-schweinchen, Ratte, zeigt bei Kettenverzweigung eine bedeutend stärkere Hemmung als A. Typ C, aus Organen von Kaninchen, Rind und Pferd, zeigt allgemein schwache Desaminierung; eine Beziehung zwischen Wirkung und Kettenlänge der Aminosäure ist nicht feststellbar. Ungefähr zur gleichen Zeit gaben *Keilin* und *Hartree*³⁾ an, dass *d*-Dopasäure und *d*-Tyrosin desaminiert würden, ebenso N-Methyl-alanin, nicht dagegen α -C-Methyl-alanin und *d,l*-N-Dimethyl-alanin. Eingehende Angaben über die Desaminierung der *d*-Aminosäuren macht auch *Krebs*⁴⁾, der mit Gewebeschnitten bzw. rohen Fermentlösungen arbeitete. Er fand bei den Desaminierungsversuchen folgenden Sauerstoffverbrauch:

	mm ³ O ₂ in	
	10 Min.	20 Min.
<i>d,l</i> -Alanin	72	138
<i>d,l</i> - α -Aminobuttersäure	29	55
<i>d,l</i> -Norvalin	25	53
<i>d</i> (-)-Valin	59	106
<i>d,l</i> -Norleucin	62,5	121
<i>d,l</i> -Leucin	27,5	55
<i>d</i> -Isoleucin	93	176

1) *B. Kisch*, *Klin. Wochschr.* **15**, 170 (1936).

2) *B. Kisch*, *Enzymologia* **1**, 97 (1936).

3) *D. Keilin*, *E. F. Hartree*, *Proc. Roy. Soc. London [B]* **119**, 114 (1936).

4) *H. A. Krebs*, *Biochem. J.* **29**, 1620 (1935).

	mm ³ O ₂ in	
	10 Min.	20 Min.
<i>d, l</i> -α-Aminocaprylsäure	4,6	11
<i>d, l</i> -Serin	43	78
<i>d, l</i> -α-Phenyl-α-aminoessigsäure	18,5	35,5
<i>d</i> (-)-Phenyl-alanin	87	143
<i>d, l</i> -Tyrosin	27	51
<i>d, l</i> -Tryptophan	9,5	19
<i>d</i> (+)-Histidin	7	16,5
<i>d, l</i> -Asparaginsäure	8,6	15
<i>d, l</i> -Glutaminsäure	3	5
<i>d, l</i> -β-Hydroxy-glutaminsäure	0	0
<i>d, l</i> -α-Amino-β, γ-dihydroxy-buttersäure	3,5	9
<i>d, l</i> -Arginin	24	41
<i>d, l</i> -Cystin	34	54
<i>d, l</i> -Methionin	139	269
<i>d, l</i> -Äthylcystein	80,5	131

Rodney und Garner¹⁾ prüften die Spezifität der Desaminierung ebenfalls an Gewebeschnitten, und zwar mit solchen aus Rattenniere und -leber. Sie erhalten folgende Resultate:

Konzentration an Aminosäure: 0,005-m.

pH aller Versuche: 7,4.

Im Gasraum: O₂

Substrat	Gewebe	Zahl der Versuche	O ₂ -Verbrauch in % d.Th.		
			Max.	Min.	Durchsch.
<i>d, l</i> -Alanin	Niere	22	135	70	106
β-Alanin	Niere	4	2	— 8	— 2
<i>d, l</i> -α, β-Diamino-propionsäure	Niere	4	39	27	33
<i>d, l</i> -Serin	Niere	4	68	35	53
<i>d, l</i> -Isoserin	Niere	4	0	— 3	— 2
<i>d, l</i> -Alanin	Leber	16	63	28	41
β-Alanin	Leber	4	3	— 3	0
<i>d, l</i> -α, β-Diamino-propionsäure	Leber	4	32	28	30
<i>d, l</i> -Serin	Leber	4	31	10	22
<i>d, l</i> -Isoserin	Leber	4	— 1	— 7	— 5

Diese Ergebnisse sind also eine Bestätigung der Feststellung von Kisch, dass Präparate aus Leber weniger wirksam sind als solche aus Niere. Felix und Zorn²⁾ führten Versuche mit Extrakt aus Schweinenieren-Trockenpulver aus. Besonders leicht desaminiert wurden nach ihren Beobachtungen die *d*-Formen von Alanin, Valin, Aminobutter-

¹⁾ G. Rodney, R. L. Garner, J. Biol. Chem. **125**, 209 (1938).

²⁾ K. Felix, K. Zorn, Z. physiol. Ch. **256**, 16 (1939).

säure, Norleucin, Asparaginsäure, Phenyl-alanin, Tyrosin, Dioxyphenyl-alanin; langsamer Leucin, Arginin, Glutaminsäure, Histidin, Serin; überhaupt nicht Glykokoll und Lysin. Dass es sich um recht rohe Extrakte handelte, geht schon aus der Tatsache hervor, dass auch Cadaverin und Putrescin abgebaut wurden. *Holtz*¹⁾ stellte fest, dass Nierenextrakte die *d*-Form der Dopasäure desaminieren.

Alle diese mit mehr oder minder gereinigten Organextrakten oder Gewebeschnitten ausgeführten Arbeiten stellten also übereinstimmend fest, dass zwar die Reaktionsgeschwindigkeit beim Abbau der *d*- α -Aminosäuren erhebliche Unterschiede aufweist, dass aber doch alle oder fast alle *d*- α -Aminosäuren von der *d*-Aminosäure-Oxydase angegriffen werden; vgl. dazu insbesondere die Schlussfolgerungen von *H. A. Krebs*²⁾³⁾.

Seit der Isolierung des reinen Ferments liegt über die Prüfung der Spezifität reiner Präparate nur eine Angabe von *Warburg* vor⁴⁾, welcher hierüber schreibt: „Als Substrat des Testes kann man statt Alanin irgendeine der anderen Aminosäuren benutzen, von denen *Krebs* gefunden hat, dass sie von seinem löslichen Ferment oxydiert werden, z. B. Prolin, Methionin, Isoleucin. Wir haben im Laufe unserer Arbeiten über die Aminosäure-oxydase keinen Anhaltspunkt dafür gefunden, dass die Oxydation der verschiedenen Aminosäuren von verschiedenen Fermenten bewirkt wird. Alle Aminosäuren, die von der rohen Fermentlösung von *Krebs* oxydiert werden, werden auch von einem Ferment oxydiert, das durch Zusammengeben des reinen Fermentproteins mit der reinen prosthetischen Gruppe entsteht“.

Wir haben eine Reihe von *d*-Aminosäuren bzw. *d,l*-Aminosäuren auf ihr Verhalten gegen unser gereinigtes Präparat von *d*-Aminosäure-oxydase geprüft. Hierbei konnten wir mit unseren Fermentlösungen, die durch Zusammengeben der annähernd reinen prosthetischen Gruppe und einer nach der Vorschrift von *Warburg*⁵⁾ hergestellten Proteinlösung aus Hammelniere erhalten worden waren, Sauerstoffverbrauch bzw. also Desaminierung wohl bei Alanin, Prolin, Methionin, Leucin, Isoleucin und Phenyl-alanin beobachten. Dagegen verhielten sich Dioxyphenyl-alanin, Histidin, Arginin, Serin, β -Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, *d,l*-Alanyl-glycin, *d,l*-Leucyl-glycin, *d,l*-Glycyl-leucin, *d,l*-Leucyl-glycyl-glycin, ferner Glucosamin, Chondrosamin, Glucosaminsäure und Chondrosaminsäure negativ. Bei denjenigen Aminosäuren, die von dem Ferment oxy-

¹⁾ *P. Holtz*, Naturwiss. **27**, 724 (1939).

²⁾ *H. A. Krebs*, Biochem. J. **29**, 1620 (1935).

³⁾ *H. A. Krebs*, Biochem. J. **29**, 1951 (1935).

⁴⁾ *O. Warburg* und *W. Christian*, Bioch. Z. **298**, 150 (1938).

⁵⁾ Biochem. Z. **298**, 150 (1938).

diert wurden, waren z. T. erhebliche Differenzen im Sauerstoffverbrauch festzustellen. Die Ergebnisse dieser Testserien konnten durchwegs reproduziert werden. Um sicher zu gehen, dass bei den ergebnislosen Versuchen das Ferment nicht durch Verunreinigungen, die in den Aminosäuren enthalten waren, vergiftet worden war, haben wir in einer weiteren Testserie nach einer Versuchsdauer von 50 Minuten Alaninlösung zugeben, worauf in allen Fällen Sauerstoffaufnahme erfolgte. Einige typische Versuchsprotokolle sind nachstehend aufgeführt:

Testserie 1.

Versuchstemperatur: 38°

Im Hauptraum: 2 cm³ Proteinlösung B (nach Warburg)

0,5 cm³ Lösung der prosthetischen Gruppe in Wasser = 10 γ

8 Tropfen einer 10-proz. Lösung der Aminosäure in Phosphatpuffer
pH 8,3

Im Ansatz: 5 Tropfen 20-proz. KOH

Im Gasraum: Luft

Schliessen der Hähne nach 10 Minuten¹⁾.

	O ₂ -Aufnahme in mm ³			
	10 Min.	20 Min.	30 Min.	60 Min.
<i>d, l</i> -Methionin	24			132
<i>d, l</i> -Prolin	24	52	65	140
<i>d, l</i> -Alanin	15	34	51	107
<i>d, l</i> -Leucin	11			47
<i>d, l</i> -Isoleucin	11			41
<i>d, l</i> -Phenyl-alanin	7			29
<i>d, l</i> -Dioxyphenyl-alanin . .	—	—	—	—
<i>d, l</i> -Histidin	—	—	—	—
<i>d, l</i> -Arginin	—	—	—	—
<i>d, l</i> -Serin	—	—	—	—
<i>d, l</i> -β-Alanin	—	—	—	—
<i>d, l</i> -Asparaginsäure	—	—	—	—
<i>d, l</i> -Glutaminsäure	—	—	—	—
<i>d, l</i> -Alanyl-glycin	—	—	—	—
<i>d, l</i> -Leucyl-glycin	—	4	—	12
<i>d, l</i> -Glycyl-leucin	—	—	—	—
<i>d, l</i> -Leucyl-glycyl-glycin . .	—	—	—	—

(Das geringe Anlaufen von Leucyl-glycin dürfte auf eine Verunreinigung des Präparates zurückzuführen sein. Alle verwendeten Präparate wurden von der Fa. *F. Hoffmann-La Roche & Cie.* in Basel bezogen.)

¹⁾ Infolge der Konstruktion des zur Verfügung stehenden Apparates konnten die Lösungen der Aminosäuren nicht unter Wasser eingekippt werden; wir haben uns so beholfen, dass von Anfang an alle Komponenten zusammengegeben wurden; die ersten 10 Minuten waren also für den Versuch verloren.

Testserie 2.

Versuchsordnung wie oben; nach 50 Minuten Zugabe von 8 Tropfen einer 10-proz. Alaninlösung in Phosphatpuffer.

	O ₂ -Aufnahme in mm ³				
	10 Min.	20 Min.	30 Min.	50 Min.	70 Min.
<i>d, l</i> -Methionin	23	52	68	119	150
<i>d, l</i> -Prolin	22	52	65	120	148
<i>d, l</i> -Alanin	16	36	50	89	114
<i>d, l</i> -Leucin	8	15	23	30	51
<i>d, l</i> -Isoleucin	7			29	52
<i>d, l</i> -Phenyl-alanin	5			21	43
<i>d, l</i> -Dioxyphenyl-alanin	—			—	25
<i>d, l</i> -Histidin	—			—	25
<i>d, l</i> -Arginin	—			—	23
<i>d, l</i> -Serin	—			—	25
<i>d, l</i> -Asparaginsäure	—			—	24
<i>d, l</i> -Alanyl-glycin	—			—	22
<i>d, l</i> -Leucyl-glycin	—			—	26
<i>d, l</i> -Leucyl-glycyl-glycin	—			—	23

Testserie 3.

Versuchsordnung wie oben.

	O ₂ -Aufnahme in mm ³		
	10 Min.	20 Min.	60 Min.
<i>d</i> -Glucosamin	—	—	—
<i>d</i> -Chondrosamin	—	—	—
<i>d</i> -Glucosaminsäure	—	—	—
<i>d</i> -Chondrosaminsäure	—	—	—
Kontrollversuch mit <i>d, l</i> -Alanin	14	33	110

Aus diesen Versuchen müssen wir die Schlussfolgerung ziehen, dass das gereinigte Ferment aus Lactoflavin-adenin-nucleotid und dem Apoferment aus Hammelniere durchaus nicht alle *d*-Aminosäuren, welche die Antipoden der Eiweiss-aminosäuren sind, anzugreifen imstande ist. Wenn durch Gewebsschnitte und Rohextrakte sämtliche *d*-Aminosäuren desaminiert werden können, so sind hier wahrscheinlich verschiedene Fermente am Werk.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.