

Das Hydrochlorid ist hygroskopisch.

$C_{18}H_{23}ON \cdot HCl$  (305.8) Ber. C 70.67 H 7.91 N 4.58 Gef. C 70.40 H 8.36 N 4.52.

*iso*- $\alpha$ -Oxy- $\beta$ -[äthyl-isopropyl-amino]- $\alpha$ , $\beta$ -diphenyl-äthan (I, R= $C_2H_5$ , R'= $C_3H_7$ ) aus *iso*- $\alpha$ -Oxy- $\beta$ -äthylamino- $\alpha$ , $\beta$ -diphenyl-äthan und Aceton; Schmp. (aus Benzol) 127–129°.

$C_{19}H_{25}ON$  (283.2) Ber. C 80.50 H 8.90 N 4.95 Gef. C 80.80 H 9.17 N 4.86.

Hydrochlorid: Schmp. 193–194° (aus Essigester + Methanol).

$C_{19}H_{25}ON \cdot HCl$  (319.7) Ber. C 71.32 H 8.20 N 4.38 Gef. C 71.04 H 8.41 N 4.71.

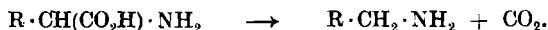
## 12. Kurt Hasse und Hans-Wilhelm Schumacher: Das Reaktionsprodukt der Decarboxylierung von *l*-Glutaminsäure mittels pflanzlicher Decarboxylase.

[Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Karlsruhe.]

(Eingegangen am 13. September 1949.)

Für die enzymatische Decarboxylierung von *l*-Glutaminsäure mit Rettichgewebe wurden optimale Bedingungen ermittelt. Als Reaktionsprodukt wurde  $\gamma$ -Amino-buttersäure isoliert.

Zahlreiche natürliche Aminosäuren lassen sich enzymatisch zu den entsprechenden Aminen decarboxylieren:



Dieser Abbau erfolgt in Gegenwart tierischer, bakterieller und pflanzlicher Enzyme. In verschiedenen Fällen ist es gelungen, bei Bakterien Stämme zu züchten oder Enzympräparate zu bereiten, mit denen eine spezifische Decarboxylierung möglich ist.

Auch *l*-Glutaminsäure wird durch zahlreiche Mikroorganismen decarboxyliert, wie zuerst Ackermann fand und wie neuerdings von Gale eingehend untersucht wurde. K. Okunuki<sup>1)</sup> erbrachte den Nachweis, daß verschiedenes Pflanzenmaterial imstande ist, *l*-Glutaminsäure zu decarboxylieren. Die Verbreitung dieser Glutaminsäure-Decarboxylase ist eine recht mannigfaltige, doch scheint ein botanischer Zusammenhang zwischen den einzelnen enzymatisch aktiven Pflanzen nicht zu bestehen. Die Decarboxylase wurde in verschiedenen Rübenarten, im Weißkohl und in Rettichen gefunden, während sich Kartoffel und Zwiebel als enzymatisch weniger aktiv erwiesen. Das Enzym zeigt eine strenge Spezifität: nur *l*-Glutaminsäure und ihr Dehydratationsprodukt, die Pyrrolidon-carbonsäure, werden angegriffen. Das pH-Optimum liegt bei 6.

Als vermutliches Reaktionsprodukt des Abbaus ist in Analogie zu anderen Aminosäuren  $\gamma$ -Amino-buttersäure anzunehmen (vergl. die obenstehende Gleichung; R= $HO_2C \cdot [CH_2]_2-$ ). Es wurde daher versucht, das Decarboxylierungsprodukt der Glutaminsäure in Substanz zu gewinnen.

Für die Annahme einer Aminbildung spricht die Beobachtung, daß die Kohlendioxyd-Bildung aus Glutaminsäure in gleicher Weise unter aeroben

<sup>1)</sup> Botanical Magazine 51, 270 [1937].

und anaeroben Bedingungen erfolgt, ohne daß eine gleichzeitige Desaminierung durch die Nessler-Probe festgestellt werden konnte. Die Bestimmung der  $\alpha$ -Aminogruppe nach van Slyke im Laufe der Decarboxylierung ergab eine Parallelität zwischen Abnahme der Aminogruppe und Decarboxyierungsgrad. Dieser Befund spricht gegen das Entstehen von  $\alpha$ -Amino-buttersäure und stützt die Annahme der Bildung von  $\gamma$ -Amino-buttersäure.

Um das Reaktionsprodukt präparativ zu gewinnen, untersuchten wir zuerst die geeigneten Bedingungen für den Ansatz.

Als Enzymmaterial verwendeten wir den Brei von Winterrettichen. Da längeres Auswaschen die Aktivität nicht herabsetzt, ist eine weitgehende Entfernung der löslichen Inhaltsstoffe des pflanzlichen Gewebes möglich. Wir bedienten uns der Warburg-Technik und ermittelten in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren die Geschwindigkeit und den Grad des Umsatzes durch Messung der Kohlendioxid-Bildung. Es zeigte sich, daß die Decarboxylierung nicht vollständig verläuft und die Konzentration von Substrat und Enzym einen großen Einfluß haben.

Glutaminsaures Natrium hemmt die Reaktion selbst noch bei geringen Konzentrationen; diese Hemmung scheint zum Teil irreversibel zu sein. Die Tafel 1 zeigt, daß bei einer Herabsetzung der molaren Konzentration des Substrats auf 0.025 ein Abbau von 74% erreicht wird.

Tafel 1. Decarboxylierung von *l*-Glutaminsäure.

$m/_{10}$ Phosph.- Puffer $p_H$ 6 ccm	Natrium- glutaminat $m$	Gesamt- flüssigkeit ccm	Enzympräp. g	% Decarboxylierung in 60 Min.
2.5	0.025	5.0	1.0	74
2.5	0.050	5.0	1.0	64
2.5	0.100	5.0	1.0	16

Mit steigender Enzymkonzentration strebt die Geschwindigkeit des Umsatzes einem Grenzwert zu (Tafel 2).

Tafel 2. Decarboxylierung von *l*-Glutaminsäure in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.

Enzympräp. g	$m/_{10}$ Phosph.- Puffer $p_H$ 6 ccm	Natrium- glutaminat 0.1 $n$ ccm	Wasser ccm	% Decarboxylierung in 60 Min.
0.5	2.5	1.0	1.5	4
1.0	2.5	1.0	1.5	16
2.0	2.5	1.0	1.5	20

Infolge der Ausschaltung eines Carboxyls der Glutaminsäure bei der Reaktion nimmt die Alkalität der Lösung zu. Zur Aufrechterhaltung des optimalen  $p_H$  sind deshalb hohe Pufferkonzentrationen erforderlich. Es zeigt sich jedoch, daß auch ohne Pufferzugabe ein weitgehender Abbau erfolgen kann, wenn freie Glutaminsäure dem Ansatz langsam hinzugefügt wird (Tafel 3).

Tafel 3. Decarboxylierung von *l*-Glutaminsäure mit und ohne Pufferzugabe.

Enzympräp. g	$m/10$ Phosph.- Puffer $p_H$ 6 ccm	Substrat 0.1 <i>m</i> je 1 ccm	Wasser ccm	% Decarboxylierung in Min.			
				30	60	150	300
2.0	0.0	Natriumglutaminat- Lösung $p_H$ 6	4.0	11	14	27	33
2.0	4.0	„	0.0	14	21	39	43
2.0	0.0	Glutaminsäure $p_H$ 3.8	4.0	12	16	33	48

Damit läßt sich die Schwierigkeit der Abtrennung der anorganischen Salze von dem wasserlöslichen Reaktionsprodukt bei präparativen Versuchen umgehen. Somit konnte festgestellt werden, daß eine präparative Decarboxylierung von Glutaminsäure bei genügend großer Verdünnung und der nötigen Enzymmenge auch ohne Zusatz von Puffer langsam aber ausreichend vollständig verlaufen dürfte, um die angenommene  $\gamma$ -Amino-buttersäure isolieren zu können.

Bei dem präparativen Ansatz ließ sich die Kohlendioxyd-Bildung wie bei den analytischen Versuchen durch Auffangen des Gases in einer Bürette annähernd quantitativ verfolgen. Nach dem Aufarbeiten des Reaktions-Gemisches durch Abpressen, Entfernen des Eiweißes und der nicht umgesetzten Glutaminsäure wurde die  $\gamma$ -Amino-buttersäure über den Äthylester und gleichzeitig entstandenes Pyrrolidon isoliert. Zum Vergleich wurden  $\gamma$ -Amino-buttersäure und ihr Platinsalz über Trimethylenbromid und  $\gamma$ -Brom-butyronitril nach Gabriel<sup>2)</sup> synthetisiert.

M. Wada<sup>3)</sup> hat eine einfache Methode angegeben, nach der sich die Hydantoine von  $\alpha$ -Aminosäuren durch Alkalien und konzentrierte Säuren in Kohlendioxyd, Ammoniak und die entsprechenden Amine spalten lassen. Aus Glutaminsäure soll  $\gamma$ -Amino-buttersäure in guter Ausbeute entstehen.

Wir konnten diese Angaben nicht bestätigen. Unsere negativen Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Befunden anderer Autoren<sup>4)</sup>, denen es ebenfalls nicht gelang, andere Aminosäuren auf diesem Wege zu Aminen zu decarboxylieren.

### Beschreibung der Versuche.

Bereitung des Enzymmaterials: Bei den vorliegenden Versuchen wurde mit schwarzem Winterrettich gearbeitet. Vorversuche zeigten, daß andere Retticharten sich in ihrer enzymatischen Wirkung nicht wesentlich von der erstgenannten unterscheiden. Der Rettich wurde auf einem feinen Reibeisen zerkleinert, und dieses Gewebe mit Leitungswasser mehrere Male ausgewaschen und gut abgepreßt. Das so erhaltene Pflanzenmaterial kann ohne weiteres als Enzympräparat angewendet werden.

### Präparative Decarboxylierung von *l*-Glutaminsäure.

In einem Rundkolben mit Quecksilberdichtung und Rührwerk wurde die Lösung von 7 g Glutaminsäure in 8 l Wasser mit 2300 g Rettichgewebe bei Zimmertemperatur umgesetzt. Der Verlauf der Decarboxylierung wurde durch Auffangen des gebildeten Kohlendioxyds in einer Gasbürette verfolgt. Nach 20 Stdn. verlief die Reaktion nur noch langsam und der Versuch wurde abgebrochen. Die Flüssigkeit des Ansatzes wurde ab-

<sup>2)</sup> B. 22, 3337 [1889].    <sup>3)</sup> Biochem. Ztschr. 260, 47 [1933].

<sup>4)</sup> M. N. Schtscherkina, C. 1940 II, 3473; H. P. Clarke, G. L. Foster u. H. J. Vickery, Biochem. Ztschr. 272, 370 [1934].

gepreßt und zur Entfernung des Eiweißes in der Kälte mit gesättigter Bleiacetat-Lösung versetzt. Überschüss. Blei wurde mit Schwefelwasserstoff als Sulfid entfernt. Aus dem i. Vak. bei 40° eingengten Filtrat trennten wir die nicht umgesetzte Glutaminsäure durch Einleiten von Chlorwasserstoff unter Eiskühlung als Hydrochlorid ab (Gesamtkrystallisation 4.5 g).

Zur Veresterung wurde der bis zum Sirup eingedampfte Kolbeninhalt mit der 5-fachen Menge absol. Äthylalkohol versetzt, die Lösung bei 20° mit trockenem Chlorwasserstoff gesättigt, der Alkohol i. Vak. abdestilliert und diese Veresterung noch zweimal wiederholt. Der Rückstand wurde mit wenigen ccm absol. Alkohol und 200 ccm absol. Äther versetzt. Aus dieser Lösung der Esterhydrochloride ließen sich die freien Ester durch Einleiten von trockenem Ammoniak unter guter Kühlung gewinnen. Die äther. Lösung wurde filtriert und nach Entfernung des Äthers das Veresterungsprodukt bei 12 Torr fraktioniert.

1. Fraktion: Sdp.<sub>12</sub> bis 74°, 2. Fraktion: Sdp.<sub>12</sub> 74–78°, 3. Fraktion: Sdp.<sub>12</sub> 125–130°.

#### γ-Amino-buttersäure aus Fraktion 2.

0.5 g Ester-Fraktion vom Sdp.<sub>12</sub> 74–78° wurden mit 10 ccm halbkonzentrierter Salzsäure 15 Min. zum Sieden erhitzt. Wir dampften dann i. Vak. zur Trockne ein und nahmen den Rückstand mit einigen Tropfen absol. Alkohol auf. Nach Zugabe von wenig Äther trübte sich die Lösung, und nach einigen Stunden hatten sich farblose Krystalle gebildet (0.1 g).

Da durch mehrmaliges Umkrystallisieren aus Alkohol + Äther der Schmelzpunkt des Hydrochlorids der γ-Amino-buttersäure nicht erreicht werden konnte, stellten wir das Platinsalz dar. 0.1 g des Hydrochlorids wurden in wenig heißem Alkohol gelöst und mit alkohol. Platinchlorid-Lösung versetzt. Beim Erkalten krystallisierten goldgelbe, glänzende Krystalle aus, die nach dem Umkrystallisieren aus heißem Alkohol bei 320° unter Zersetzung schmolzen.

Die freie γ-Amino-buttersäure wurde durch Zersetzung des Platinsalzes mit Schwefelwasserstoff gewonnen. Im Filtrat des Platinsulfids fällten wir die Chlor-Ionen mit Silbercarbonat und gelöstes Silber mit Schwefelwasserstoff. Nach dem Einengen auf dem Wasserbad wurde der Rückstand mit 0.5 ccm Wasser aufgenommen und mit 5 ccm absol. Alkohol versetzt. Die Lösung stellten wir in ein Kältebad, worauf nach einigen Stunden Krystallisation eintrat (0.025 g); Zersp. 203°.

C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N (103.0) Ber. C 46.58 H 8.79 N 13.58 Gef. C 46.22 H 8.63 N 13.59.

#### γ-Amino-buttersäure aus Fraktion 3.

Der Siedepunkt der 3. Fraktion der Estertrennung ließ auf Pyrrolidon schließen. Auch diese Fraktion wurde in gleicher Weise verseift. Unter Öffnung des Lactamringes entstand ebenfalls das Hydrochlorid der γ-Amino-buttersäure, das in gleicher Weise gereinigt wurde.