

**143. Wilhelm Franke und Ezz-Eldin M. Taha: Purinoxydierende Fermente aus Schimmelpilzen, III. Mitteil.: Zur Kenntnis der Alternaria-Uricasen\*)**

[Aus dem Institut für Gärungswissenschaft und Enzymchemie an der Universität Köln]  
(Eingegangen am 13. April 1952)

Während die Uricase aller bisher untersuchten Alternaria-Arten und -Stämme Harnsäure unter Aufnahme eines Atoms Sauerstoff zu Allantoin oxydiert, vermittelt das Ferment eines ägyptischen Alternaria tenuis-Stamms (VII)<sup>1a</sup>) als einziges die doppelte Sauerstoffaufnahme. Als Zwischenprodukt läßt sich auch in diesem Falle Allantoin nachweisen, das unter NH<sub>3</sub>-Abspaltung höchstwahrscheinlich zu Oxonsäure (Allantoxansäure) weiter oxydiert wird.

In der I. Mitteilung<sup>1)</sup> dieser Reihe war bereits erwähnt worden, daß Ferment-Lösungen aus einem deutschen Alternaria tenuis-Stamm (VI/1)<sup>1a</sup>) Harnsäure in ein Produkt überführen, das die rote Farbreaktion von R. Fosse u. V. Bossuyt<sup>2)</sup> gibt und das einstweilen mit Vorbehalt als Allantoin angesprochen wurde, obwohl es nach der geringen Spezifität dieser Reaktion auch Uroxansäure oder Oxyacetylen-diurein-carbonsäure sein könnte. Dagegen war bei der Wirkung des Ferments aus einem ägyptischen Alternaria tenuis-Stamm (VII)<sup>1</sup>), das als einziges die Aufnahme von zwei Atomen Sauerstoff pro Harnsäuremolekül katalysiert („Uricase II“), diese Farbreaktion negativ ausgefallen, und zwar gleichermaßen bei O<sub>2</sub>-Aufnahmen, die etwa 1/3, 1/2 und 2/3 des theoretischen Endwerts betragen hatten.

Nachdem in der II. Mitteilung<sup>3)</sup> die quantitative Verfolgung der Uricolyse am Aspergillus-Ferment ausgearbeitet worden war, sollte in der vorliegenden Arbeit eine Klärung der Verhältnisse bei den beiden Ferment-Typen von Alternaria erfolgen, die früher kurz als „Uricase I“ und „Uricase II“ bezeichnet worden waren.

### 1.) „Uricase I“

Da nach den Ergebnissen der vorangehenden beiden Mitteilungen „Uricase I“ aus Aspergillus und aus Alternaria in ihren Eigenschaften und ihrem Wirkungsmechanismus weitgehend übereinstimmen, war eine solche Übereinstimmung auch für den Chemismus der Enzymreaktion zu erwarten.

a) Verhältnis von O<sub>2</sub>-Aufnahme, Harnsäure-Abnahme und Allantoin-Bildung: In der folgenden Doppel-Abbild. 1 sind, wie früher ähnlich bei Aspergillus fumigatus, für gereinigte Ferment-Lösungen aus Alternaria tenuis VI/1 und Alternaria solani VI/1 die Werte für O<sub>2</sub>-Verbrauch, verschwundene Harnsäure und gebildetes Allantoin zu bestimmten Versuchszeiten dargestellt.

\* ) Herrn Geheimrat Professor H. Wieland in dankbarer Verehrung zum 75. Geburtstage.

<sup>1)</sup> W. Franke, E. M. Taha u. L. Krieg, Arch. Mikrobiol. 17, 255 [1952].

<sup>1a)</sup> Herkunft und Bezeichnungsweise der Stämme (VI/1, VII usw.) ist die in der I. Mitteil. angegebene. <sup>2)</sup> Compt. rend. Acad. Sciences 188, 106 [1929].

<sup>3)</sup> W. Franke u. L. Krieg, B. 85, 779 [1952].

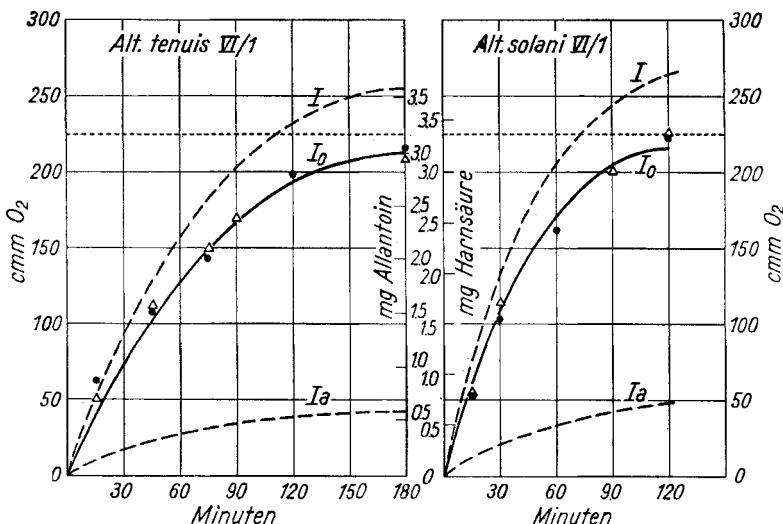


Abbildung 1. Korrigierte O<sub>2</sub>-Aufnahme —, Harnsäure-Abnahme △-△-△ und Allantoin-Bildung •-•-• mit gereinigten Alternaria-Fermenten (Ammoniumsulfatfällungen bei 8/10-Sättigung)

I Brutto-O<sub>2</sub>-Aufnahme

Enzymtrockengew. je Ansatz

Ia Enzym-Eigenatmung

Alt. tenuis 8.0 mg,

I<sub>o</sub> Korrigierte O<sub>2</sub>-Aufnahme

Alt. solani 6.0 mg

Es handelt sich wieder um sog. „Normalansätze“ von 5 ccm Gesamtvolume,  $m_{250}$  Lithiumurat und  $m_{25}$  Phosphatpuffer ( $pH$  7.0) enthaltend, die bei 30° in Luft liefern.

Die Bestimmung der O<sub>2</sub>-Aufnahme erfolgte wiederum manometrisch, die Bestimmung von Harnsäure und Allantoin photometrisch nach den in der II. Mitteil.<sup>3)</sup> gemachten methodischen Angaben. Die Ordinatenmaßstäbe sind so abgeglichen, daß 224 cmm O<sub>2</sub> (= 10  $\mu$ Mol) 3.36 mg Harnsäure und 3.16 mg Allantoin (jeweils = 20  $\mu$ Mol) entsprechen.

Die Abbild. 1 läßt eindeutig erkennen, daß auch bei der Wirkung des Alternaria-Ferments je aufgenommenes Sauerstoff-Atom ein Molekül Harnsäure verschwindet und ein Molekül Allantoin (oder eine ähnliche Substanz) entsteht.

b) Bestimmung des Respirationsquotienten (RQ): Da nur bei der Bildung von Allantoin aus Harnsäure gleichzeitig ein Molekül CO<sub>2</sub> abgespalten wird, gestattet u.U. schon die Bestimmung des Respirationsquotienten allein eine Entscheidung über das die Farbreaktion gebende Produkt<sup>4)</sup>.

Die Tafel 1 enthält in der üblichen Anordnung für die oben erwähnten beiden Alternaria-Arten Angaben über die unkorrigierten und die (um die Enzym-Eigenatmung) korrigierten Respirationsquotienten (RQ bzw. RQ<sub>A</sub>).

<sup>4)</sup> Zwischen Oxyacetylen-diurein-carbonsäure und Uroxansäure kann allerdings allein auf Grund des RQ (= 0) nicht unterschieden werden. Hierzu müßte u.U. eine NH<sub>2</sub>-Gruppen-Bestimmung herangezogen werden (vergl. F. W. Klemperer, Journ. biol. Chem. 160, 111 [1945]).

**Tafel 1. Respirationsquotient des Harnsäure-Abbaus durch Alternaria-Uricase I**

Ammoniumsulfatfällungen ( $\frac{9}{10}$ -Sättigung); Enzymtrockengew. je Ansatz bei Alt. tenuis 10.2 mg, bei Alt. solani 8.6 mg; H = Harnsäure

Zeit (Min.)	emm O <sub>2</sub>			emm CO <sub>2</sub>			RQ	RQ <sub>d</sub>
	ohne H.	mit H.	Δ	ohne H.	mit H.	Δ		
Alt. tenuis VI/1								
30	29	149	120	40	259	219	1.73	1.82
90	68	255	187	75	415	340	1.64	1.82
Alt. solani VI/1								
30	48	153	105	60	248	188	1.62	1.80
90	80	204	124	106	344	238	1.70	1.93

Die (bei Leeratmungen dieser Größe maßgebenden<sup>5)</sup>) korrigierten RQ-Werte liegen nur wenig unter 2, dem theoretischen Wert für quantitative Allantoin-Bildung<sup>6)</sup>.

Sollte den Abweichungen von diesem Werte wirklich Bedeutung zukommen (was bei der geringen Zahl der Versuche nicht zu entscheiden ist), so würde die Menge u.U. gebildeter, nicht CO<sub>2</sub> liefernder Nebenprodukte doch höchstens 10% betragen.

## 2.) „Uricase II“

Die Untersuchungen an diesem Ferment-Typ und seinen Wirkungen waren sehr behindert durch die allmähliche Degeneration des hierfür allein zur Verfügung stehenden Alternaria tenuis-Stamms VII, über die in der I. Mitteil. bereits berichtet worden war.

Innerhalb von  $1\frac{1}{2}$  Jahren nahm der (aus der Anfangsgeschwindigkeit berechnete) Q<sub>O<sub>2</sub></sub>-Wert<sup>7)</sup> von Rohextrakten von 17 auf 6 ab. In diesen schwächer gewordenen Ferment-Lösungen war aber zugleich eine Labilisierung des Ferments erfolgt, so daß schließlich als Endwert der O<sub>2</sub>-Aufnahme nur noch  $\frac{1}{3}\text{--}\frac{1}{4}$  des theoretischen (2 Atome O je Harnsäuremolekül) erreicht wurde. Trotzdem war der Ferment-Typ als solcher erhalten geblieben, wie später (in Abbild. 2) noch gezeigt werden wird.

Es gelang zwischendurch (August 1951), durch Änderung des Nährmediums (Czapek-Dox-Lösung + Hefewasser 1:1 statt Czapek-Dox-Lösung allein) eine weitgehende Regenerierung der Fermentaktivität unseres Stammes zu erreichen, entsprechend Q<sub>O<sub>2</sub></sub>-Werten der Rohextrakte von etwa 13. Aus dieser Zeit stammen die meisten der nachfolgend beschriebenen Versuche. Die Reaktivierung des Stammes erwies sich als nur vorübergehend. Nach wenigen Wochen setzte erneuter Aktivitätsabfall ein, der sich durch weitere Variationen des Nährmediums nicht mehr nennenswert aufhalten ließ. Zuletzt verwendeten wir zur Züchtung des Pilzes meist eine modifizierte Czapek-Dox-Lösung mit Harnsäure als Stickstoffquelle.

<sup>5)</sup> Nach früheren Befunden<sup>8)</sup> dürfen Leeratmungen bis etwa 30% des Bruttowerts zur Ermittlung des tatsächlichen Harnsäure-Abbaus voll abgezogen werden.

<sup>6)</sup> Bei dieser Gelegenheit wurde auch noch in einem Doppelversuch der Respirationsquotient für das Ferment von Fusarium sambucinum bestimmt; es wurde für RQ (nach 30 und 90 Min.) 1.97 und 1.8, für RQ<sub>d</sub> 2.0 und 2.1 gefunden.

<sup>7)</sup> 
$$Q_{O_2} = \frac{\text{emm}}{\text{mg Enzymtrockengew.} \times \text{Stdn.}}$$
 unter den Bedingungen des „Normalansatzes“.

a) Die Bestimmung des Respirationsquotienten (Tafel 2) wurde hier mit einer Reihe gereinigter Ferment-Lösungen in einem größeren Bereich der O<sub>2</sub>-Aufnahme durchgeführt. Im übrigen entsprachen die Bedingungen ganz denen der Versuche von Tafel 1.

Tafel 2. Respirationsquotient des Harnsäure-Abbaus durch Alternaria-Uricase II

Ammoniumsulfatfällungen ( $\frac{9}{10}$ -Sättigung); Enzymtrockengew. je Ansatz zwischen 3.4 und 5.1 mg; Versuchszeiten zwischen 15 und 180 Min.; H = Harnsäure

Enzym-Lösung	cmm O <sub>2</sub>			cmm CO <sub>2</sub>			RQ	RQ <sub>A</sub>
	ohne H.	mit H.	Δ	ohne H.	mit H.	Δ		
I	10	86	76	16	147	131	1.71	1.73
II	23	137	114	25	197	172	1.44	1.51
III	20	214	194	30	239	209	1.12	1.08
IV	42	290	248	43	308	265	1.06	1.07
V	54	378	324	62	400	338	1.06	1.04

Hier fällt der Respirationsquotient, abweichend von den Verhältnissen bei Uricase I, mit steigender O<sub>2</sub>-Aufnahme ab, und zwar von wenigstens 1.7 bis auf rund 1; schon bei Aufnahme von einem Atom Sauerstoff (224 cmm) ist dieser Grenzwert praktisch erreicht. Der Reaktionsablauf ist hier also nicht einheitlich; der hohe Anfangswert des Respirationsquotienten deutet darauf hin, daß auch bei der Wirkung von „Uricase II“ primär Allantoin gebildet wird, später aber wieder verschwindet.

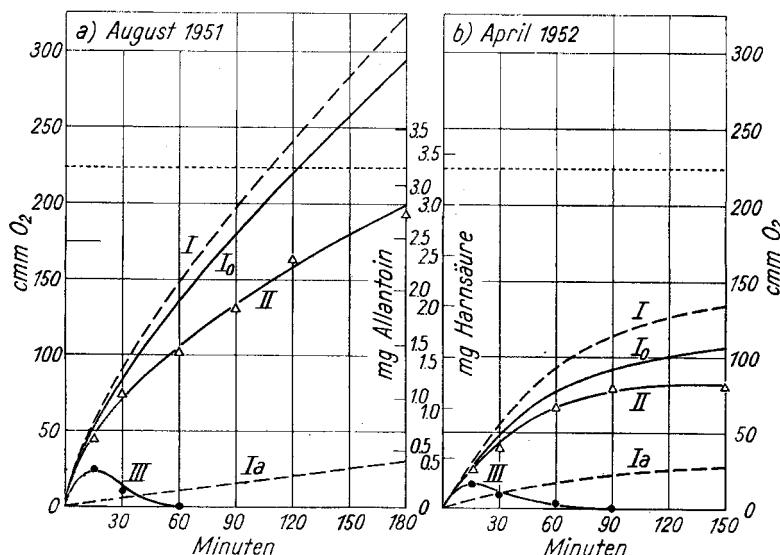


Abbildung 2. Korrigierte O<sub>2</sub>-Aufnahme —, Harnsäure-Abnahme ▲-▲-▲ und Allantoin-Bildung •---• mit gereinigtem Alternaria-Ferment (Ammoniumsulfatfällung bei  $\frac{9}{10}$ -Sättigung)

I Brutto-O<sub>2</sub>-Aufnahme

II Harnsäure-Abnahme

Ia Enzym-Eigenatmung

III Allantoin-Zunahme

I<sub>0</sub> Korrigierte O<sub>2</sub>-Aufnahme

Enzytmürtrockengew. je Ansatz Alt. tenuis VII. a : 4.0 mg, b : 7.0 mg

b) Verhältnis von O<sub>2</sub>-Aufnahme, Harnsäure-Abnahme und Allantoin-Bildung: Qualitative Vorversuche ergaben, daß in der Tat die Farbreaktion auf Allantoin hier nur bei kurzen Versuchszeiten (15–30 Min.) positiv ausfällt, während anderseits die Farbreaktion der Harnsäure (nach Folin u. Wu) auch bei mehrstg. Versuchsdauer nicht vollständig verschwindet.

Die Abbild. 2a gibt das Ergebnis einer Versuchsreihe mit gereinigtem Ferment guter Aktivität wieder, in der wie früher (Abbild. 1) außer der O<sub>2</sub>-Aufnahme zu bestimmten Zeiten auch Allantoin und Harnsäure quantitativ bestimmt wurden. Auch die Wahl der Maßstäbe war die gleiche wie in Abbild. 1. Die Abbild. 2b zeigt zum Vergleich einen Versuch aus letzter Zeit mit dem Enzym des bereits degenerierten Stamms.

Es ist klar ersichtlich, daß Allantoin hier nur in den frühen Reaktionsphasen in nennenswertem Maße auftritt, um später wieder zu verschwinden. Die Abnahme der Harnsäure erfolgt (verglichen mit der O<sub>2</sub>-Aufnahme) langsamer als bei der Wirkung von Uricase I; bei Aufnahme von einem Atom Sauerstoff (nach etwa 120 Min.) sind erst annähernd  $\frac{3}{4}$  der eingesetzten Harnsäure verschwunden; bis in die Nähe des Endwerts der O<sub>2</sub>-Aufnahme lassen sich noch kleine Harnsäuremengen nachweisen.

So wurden in vier Versuchen mit verschiedenen Enzympräparaten bei höheren O<sub>2</sub>-Aufnahmen noch folgende Harnsäuremengen (in % der Ausgangsmenge) gefunden:

cmm O <sub>2</sub> .....	286	323	396	450
cmm O <sub>2</sub> korrig. ....	238	291	352	380
% Harnsäure .....	21	18	17	13

Bemerkenswert ist die Konstanz des Ferment-Typs auch in dem geschwächten Ferment der degenerierten Kultur. Unsere anfängliche Vermutung, daß die Reduktion der O<sub>2</sub>-Aufnahme auf einem Übergang von „Uricase II“ in „Uricase I“ beruhe, hat sich nicht bestätigt.

c) Allantoin als Substrat: Erfolgte der Harnsäure-Abbau auch bei „Uricase II“ über Allantoin, so mußte dieses auch als alleiniges Substrat mit ähnlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden wie Harnsäure. Dies war nun in der Tat der Fall. An fünf verschiedenen aktiven Enzym-Lösungen – drei Rohextrakten und zwei Ammoniumsulfattällungen ( $\frac{1}{2}$ -Sättigung) – wurde das Verhältnis der Oxydationsgeschwindigkeiten von Allantoin und Harnsäure unter den Bedingungen des Normalansatzes bestimmt: die Anfangsgeschwindigkeit der Allantoin-Oxydation variierte zwischen 57 und 84% derjenigen der Harnsäure-Oxydation.

Für die Einzelpräparate wurden folgende Geschwindigkeitsverhältnisse Allantoin/Harnsäure (in %) gefunden:

	I <sub>roh</sub>	II <sub>roh</sub>	III <sub>roh</sub>	I <sub>rein</sub>	II <sub>rein</sub>
nach 15 Min. .....	57	81	84	65	73
nach 60 „ .....	55	68	82	77	71

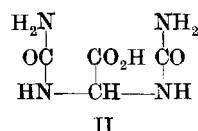
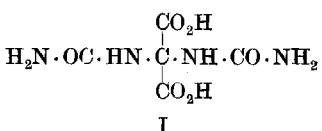
Auch in Ferment-Lösungen aus der degenerierten Kultur war das Geschwindigkeitsverhältnis nicht nennenswert verändert. Wir geben zur Illustrierung in der Tafel 3 typische Reaktionsbilder zweier Rohextrakte vom Anfang und vom Ende dieser Untersuchung.

Tafel 3.  $O_2$ -Aufnahmen zweier Rohextrakte mit Harnsäure und Allantoin  
 cmm  $O_2$ ; Normalansätze mit 2 ccm Enzym (53 bzw. 26 mg Trockengew.).  
 A = Allantoin, H = Harnsäure, A/H  $\times 100$  = proz. Geschwindigkeitsverhältnis

Zeit (Min.)	Dez. 1950				März 1952			
	cmm $O_2$		A/H $\times 100$		cmm $O_2$		A/H $\times 100$	
	ohne Zusatz	+A			+H	ohne Zusatz	+A	
15	14	139	172	81	11	40	56	72
30	22	191	265	72	19	79	100	79
45	35	229	329	70	27	105	123	85
60	41	248	362	68	34	124	153	81

Die Oxydation von Allantoin ist unseres Wissens als isolierte Fermentreaktion noch nicht beschrieben worden<sup>8)</sup>.

d) Weitere Uricolyse-Produkte als Substrate: Wir haben bei dieser Gelegenheit auch noch das Verhalten zweier weiterer unter bestimmten Bedingungen als Produkte der Uricolyse auftretender Verbindungen, nämlich der



Uroxansäure (I) und der Allantoinsäure (II)<sup>9)</sup>, geprüft, und zwar bei der üblichen Konzentration ( $m/_{250}$ ) des Normalansatzes. Die Abbild. 3 gestattet einen Vergleich der Umsetzungsgeschwindigkeiten von Harnsäure, Allantoin, Allantoinsäure und Uroxansäure.

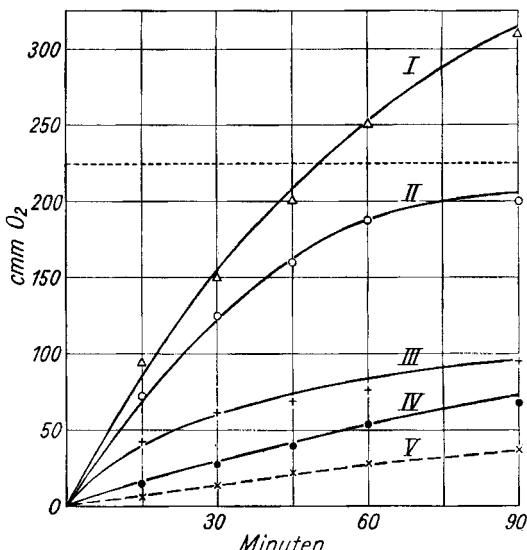
Ersichtlich kommt nur Allantoin der Harnsäure hinsichtlich der Reaktionsfähigkeit nahe, wobei noch zu berücksichtigen ist, daß die  $O_2$ -Endabsorptionen im Verhältnis 1 : 2 stehen (s.u.). Die besonders geringe Umsetzungsgeschwindigkeit der Allantoinsäure, verglichen mit Allantoin, schließt bei dessen enzymatischer Oxydation eine primäre Hydrolyse aus.

Damit im Einklang stehen in der I. Mitteil.<sup>1)</sup> bereits mitgeteilte Befunde, wonach Allantoinase in unseren Enzympräparaten nicht oder nur spurenweise vorkommt. Allantoin, das vor der Oxydation 1 Stde. im Vakuumröhren mit Enzym bei 30° incubiert worden war, zeigte dementsprechend auch die gleiche Oxydationsgeschwindigkeit wie nicht incubiertes Allantoin.

e) Chemismus der Allantoin-Oxydation: Zunächst wurden die  $O_2$ -Aufnahme und der Allantoinschwund — dieser wieder mit der modifizierten photometrischen Methode nach Fosse u. Bossuyt — vergleichend verfolgt.

<sup>8)</sup> St. J. Przylecki (Arch. internat. physiol. 24, 238 [1925]) hatte einen oxydativen Allantoin-Abbau zu Harnstoff,  $\text{NH}_3$  und Oxalsäure zwar für Amphibiengewebe (Frosch) angegeben, ohne jedoch nähere Belege für den Ablauf dieser zweifellos komplexen Reaktion zu geben.

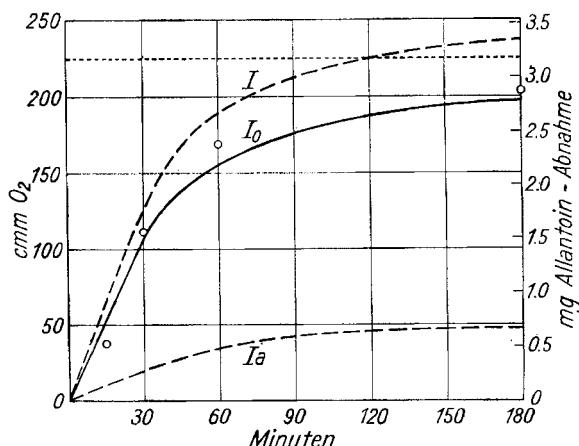
<sup>9)</sup> Über die Rolle dieser Verbindungen bei der Uricolyse vergl. die Literaturübersicht der II. Mitteil. <sup>3)</sup>.



Abbild. 3. O<sub>2</sub>-Aufnahme durch Harnsäure und einige ihrer Abbauprodukte in Gegenwart gereinigten Alternaria-Ferments (Ammoniumsulfatfällung bei  $\frac{1}{2}$ -Sättigung) I Harnsäure, II Allantoin, III Uroxansäure, IV Allantoinsäure, V Kontrolle (Enzym allein)

Normalansätze; Enzymtrockengew. je Ansatz 4.6 mg; O-Äquivalent der Substrate 224 cmm

Die Abbild. 4 zeigt, daß je Aufnahme eines Sauerstoffatoms ein Allantoinmolekül verschwindet.



Abbild. 4. Korrigierte O<sub>2</sub>-Aufnahme — und Allantoin-Abnahme o—o—o mit gereinigtem Alternaria-Ferment (Ammoniumsulfatfällung bei  $\frac{1}{2}$ -Sättigung) I Brutto-O<sub>2</sub>-Aufnahme, I<sub>a</sub> Enzym-Eigenatmung, I<sub>0</sub> korrigierte O<sub>2</sub>-Aufnahme Normalansätze; Enzymtrockengew. je Ansatz 9.5 mg

Für den Respirationsquotienten der Allantoin-Oxydation war nach den für die späteren Phasen der Harnsäure-Oxydation gemachten Feststellungen (Tafel 2) von vorneherein ein niedriger Wert zu erwarten. Die Ergebnisse der Tafel 4 bestätigen diese Annahme.

Tafel 4. Respirationsquotient der Allantoin-Oxydation durch *Alternaria*-Ferment

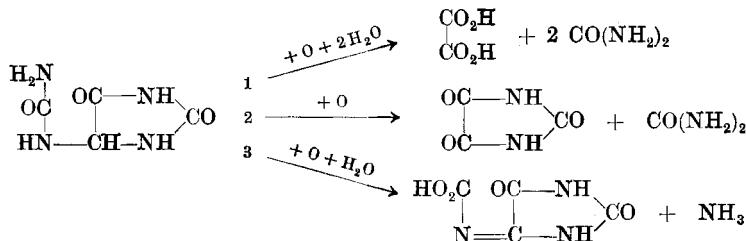
Ammoniumsulfatfällung bei  $\frac{1}{2}$ -Sättigung; Enzymtrockengew. je Ansatz 3.9 mg;  
A = Allantoin

Zeit (Min.)	cmm O <sub>2</sub>			cmm CO <sub>2</sub>			RQ	RQ <sub>4</sub>
	ohne A.	mit A.	Δ	ohne A.	mit A.	Δ		
45	22	136	114	19	26	7	0.19	0.06
95	35	244	209	30	78	48	0.32	0.23

Auch bei fast erreichtem Endwert der enzymatischen Oxydation liefert ein Allantoinmolekül höchstens 0.12 Mol. CO<sub>2</sub>, was einer unbedeutenden Neben- bzw. Folgereaktion entspricht.

Für das Produkt der „Uricase II“-Wirkung ließ sich nach den bisherigen Ergebnissen aussagen, daß es aus der Zwischenstufe Allantoin durch direkten oxydativen bzw. dehydrierenden Angriff ohne primäre Hydrolyse und ohne CO<sub>2</sub>-Abgabe entstanden sein mußte. Unter Berücksichtigung des Umstands, daß die chemische Struktur des Allantoins eine weitere Oxydation nur an den beiden miteinander verbundenen C-Atomen (C<sup>4</sup> und C<sup>5</sup> der Harnsäure) erlaubt, erscheinen drei Möglichkeiten vom chemischen und enzymatischen Standpunkt aus diskutierbar:

1. Unter oxydativer Ringsprengung und Seitenketten-Abspaltung werden Oxalsäure und Harnstoff gebildet.
2. Unter oxydativer Abspaltung der Seitenkette allein werden Parabansäure und Harnstoff gebildet.
3. Unter Verkürzung der Seitenkette durch Ammoniak-Abspaltung und gleichzeitiger Dehydrierung entsteht Oxonsäure (Allantoxansäure):



Von diesen Reaktionswegen ist der erste, die oxydative Bildung von Oxalsäure und Harnstoff, enzymchemisch nicht sonderlich wahrscheinlich, der viel näher liegende hydrolytisch-oxydative (über Glyoxylsäure) wegen des Ausfalls der Allantoinasewirkung hier nicht gangbar.

Die von H. Kleinmann u. H. Bork<sup>10)</sup> angegebene Bildung von Oxalsäure und Harnstoff neben Allantoin beim Harnsäure-Abbau durch Leberferment bietet keine Stütze. Allantoin wird nämlich von dem verwendeten Uricasepräparat nicht angegriffen und die Autoren nehmen daher an, daß die Gabelung der Reaktionswege bereits bei der Oxyacetylen-diurein-carbonsäure bzw. ihrem Decarboxylierungsprodukt, dem Oxyacetylen-diurein, erfolgt, das einmal nichtoxydativ in Allantoin, das andere Mal oxydativ in Oxalsäure und Harnstoff zerfallen soll<sup>11)</sup>.

Die zweite und die dritte Reaktionsmöglichkeit erscheinen chemisch ziemlich gleichwertig. Da im einen Falle Harnstoff, im anderen Ammoniak als zweites Reaktionsprodukt auftreten sollte, wurde durch NH<sub>3</sub>-Bestimmung in Reaktionsansätzen eine Entscheidung versucht.

Bei der angewandten Methode wurde NH<sub>3</sub> durch Zugabe gesättigten Boratpuffers von pH 10.1 zur Reaktions-Lösung ausgetrieben, bei 50–55° i. Vak. in verd. Schwefelsäure absorbiert und mit Nesslers Reagens colorimetrisch bestimmt. Die im substratfreien Kontrollansatz nachweisbare NH<sub>3</sub>-Menge wurde bei der Berechnung in Abzug gebracht.

In der folgenden Tafel 5 ist das Ergebnis zweier derartiger Bestimmungen in Ansätzen mit Allantoin als Substrat zusammengestellt.

In Fettdruck sind % O<sub>2</sub>-Aufnahme und % NH<sub>3</sub>-Bildung hervorgehoben. Die eingesetzte Allantoinmenge (20 µMol) würde bei vollständiger Oxydation nach dem Reaktionsweg 3 224 cmm O<sub>2</sub> verbrauchen und 2.0 ccm m/100 NH<sub>3</sub> bilden.

Tafel 5. O<sub>2</sub>-Aufnahme und NH<sub>3</sub>-Bildung bei der enzymatischen Allantoin-Oxydation

Ammoniumsulfatfällung bei 1/2-Sättigung; Q<sub>O<sub>2</sub></sub> (Harnsäure) 66; Enzymtrockengewicht je Ansatz 3.8 mg. A = Allantoin

Zeit (Min.)	cmm O <sub>2</sub>			% O <sub>2</sub>	ccm m/100-NH <sub>3</sub>			% NH <sub>3</sub>
	ohne A.	mit A.	Δ		ohne A.	mit A.	Δ	
45	24	108	84	38	0.10	0.84	0.74	37
150	50	184	134	60	0.14	0.98	0.84	42

Nach 45 Min. stimmen O<sub>2</sub>-Verbrauch und NH<sub>3</sub>-Bildung fast theoretisch überein, während nach 150 Min. die letztere um etwa 1/3 hinter dem ersten zurückbleibt. Dieses Ergebnis bedeutet zusammen mit den früher mitgeteilten immerhin eine starke Stütze der Oxonsäure-Theorie. Hinzu kommt, daß Oxon-

<sup>10)</sup> Biochem. Ztschr. 262, 20 [1933].

<sup>11)</sup> Die Angabe von Kleinmann u. Bork ist unseres Wissens die einzige, wonach für die Uricolyse im Warmblüter eine über 1 Atom O je Harnsäuremolekül hinausgehende O<sub>2</sub>-Aufnahme anzunehmen wäre (für die Uricolyse im Kaltblüter vergl. dagegen St. J. Przylecki<sup>8)</sup>). Leider wurde der O<sub>2</sub>-Verbrauch als solcher in der Untersuchung nicht gemessen. Bei der Arbeit von Kleinmann u. Bork<sup>10)</sup> fällt auf, daß sie mit ungewöhnlich langen Versuchszeiten (24–72 Std., bei 37°), zudem unter O<sub>2</sub>-Durchleitung arbeiteten. Da von der Zugabe eines Antisepticums nicht die Rede ist, wird man an die Wirkung von Bakterien zu denken haben, von denen viele Arten Harnsäure abzubauen vermogen (vergl. z.B. J. L. Morris u. E. E. Ecker, Journ. infect. diseas. 84, 592 [1924]; R. F. Hanzal u. E. E. Ecker, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 28, 815 [1931]; R. Truszkowski, Biochem. Journ. 24, 1340 [1930]). Auch zeigt nach unseren Erfahrungen nicht ganz reine Harnsäure eine beträchtliche Autoxydation (vergl. A. Ionescu Matiu u. A. Popesco, Bull. Soc. Chim. biol. Paris 21, 264 [1939]).

säure als Substrat vom Enzym überhaupt nicht angegriffen wird; die  $O_2$ -Aufnahmen mit und ohne Kaliumoxonat ( $m/_{250}$ ) sind innerhalb der Fehlergrenzen gleich.

Als ein indirektes Argument für die Oxonsäure-Bildung (das sich direkt nur gegen die Reaktionsmöglichkeiten 1 und 2 richtet) wäre noch der beträchtliche Urease-Gehalt unserer Enzympräparate anzuführen<sup>12)</sup>.

So bildete eine gereinigte Enzym-Lösung (Ammoniumsulfatfällung, Q<sub>0.5</sub> (Harnsäure) 104, Enzymtrockengewicht je Ansatz 7.2 mg) im Normalansatz mit 1 ccm  $m/_{50}$  Harnstoff als Substrat folgende NH<sub>3</sub>-Mengen:

Nach Minuten .....	15	40	90	120
ccm $m/_{100}$ NH <sub>3</sub> .....	1.74	2.20	3.05	3.50
% d. Maximalmenge ....	44	55	76	88

Wenn hier auch die doppelte Enzymmenge verwendet wurde wie in dem Versuch der Tafel 5, so bedeutet die Anwesenheit von Urease auf jeden Fall, daß primär gebildeter Harnstoff in erheblichem Umfang zu NH<sub>3</sub> und CO<sub>2</sub> aufgespalten wird und daß RQ bei der Allantoin-Oxydation dann nicht mehr bei 0, sondern höher (max. bei 2) liegen muß. Dagegen sprechen aber die Befunde der Tafel 4.

Da durch die Degeneration unseres Pilzstammes der geplante präparative Nachweis der Oxonsäure unmöglich geworden war<sup>13)</sup> und die Untersuchungen aus äußeren Gründen zudem einige Zeit unterbrochen werden müssen, haben wir unsere vorläufigen Ergebnisse hier mitgeteilt, obwohl die Bildung von Oxonsäure durch sie nicht bewiesen, sondern nur sehr wahrscheinlich gemacht worden ist. Oxonsäure erscheint aber als enzymatisches Reaktionsprodukt auch insofern verständlich, als für sie schon lange bekannt ist, daß sie – ähnlich wie die anderen Produkte der Uricolyse (Oxyacetylen-diurein-carbonsäure, Allantoin, Uroxansäure) – bei der alkalischen Oxydation von Harnsäure auf rein chemischem Wege, sei es mit Sauerstoff<sup>14,15)</sup>, sei es mit Permanganat<sup>14,16)</sup>, leicht erhalten werden kann.

Ungeklärt bleibt einstweilen auch die Frage, ob die Allantoin-Oxydation noch in den Spezifitätsbereich der „Uricase II“ – die bisher auf eine einzige Variante von *Alternaria tenuis* beschränkt scheint<sup>17)</sup> – fällt, oder aber durch eine spezifische, mit der „normalen“ Uricase vergesellschaftete Allantoin-oxydase bzw. -aerodehydrase zustande kommt, was vom enzym-chemischen Standpunkte aus wohl wahrscheinlicher wäre. Denn im erstgenannten Falle müßte es zwei Uricasen unterschiedlicher Spezifität geben, wofür unseres Wissens kein ähnlich gelagerter Fall bekannt ist. Andrerseits erlaubt das in dieser und der I. Mitteilung beigebrachte Material keinen sicheren Schluß auf eine zusammengesetzte Natur der „Uricase II“.

<sup>12)</sup> Das Vorkommen einer aktiven Urease in Aspergillen ist wiederholt festgestellt und untersucht worden (D. Bach, Bull. Soc. chim. biol. 11, 1007 [1927]; A. Brunel, ebenda 19, 747 [1937], 21, 380 [1939]).

<sup>13)</sup> Versuche, aus Einzell-Kulturen wieder aktives Mycelmaterial zu erhalten, sind vorgesehen.

<sup>14)</sup> H. Biltz u. R. Robl, B. 58, 1967 [1920].

<sup>15)</sup> W. Schuler u. W. Reindel, Ztschr. physiol. Chem. 215, 258 [1933].

<sup>16)</sup> E. E. Sundwik, Ztschr. physiol. Chem. 20, 335 [1895].

<sup>17)</sup> Von einer Mutante kann man hier wohl nicht sprechen, da der ägyptische *Alternaria*-Stamm ja mehr leistet als die übrigen, u. U. ein Enzym mehr enthält als jene.

Von dem von Präparat zu Präparat etwas variierenden Verhältnis der Allantoin- zur Harnsäure-Oxydation (0.57–0.84) abgesehen, waren früher<sup>1)</sup> auch schon gewisse quantitative Unterschiede zwischen den beiden Uricase-Typen beobachtet worden, so hinsichtlich der Empfindlichkeit gegen niedere HCN- und NH<sub>2</sub>OH-Konzentrationen sowie im Verhalten gegenüber Acceptorfarbstoffen. Gegenüber den zahlreichen gemeinsamen Zügen traten diese kleinen Differenzen aber stark zurück. Auch in der Spezifitätsfrage kann eine Entscheidung nur durch neue Versuche, insbesondere Fermentreinigungsversuche, erreicht werden, deren Erfolg aber an das Vorliegen aktiven Ausgangsmaterials geknüpft ist.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir für finanzielle Förderung dieser Untersuchung.

### Beschreibung der Versuche

Methodisch schließt sich die vorliegende Untersuchung vollständig an die vorangegehende II. Mitteilung<sup>2)</sup> an. Die dortigen Ausführungen über Pilzmaterial, Herstellung von Enzym-Lösungen, Bestimmung von Enzymwirkungen, Harnsäure-Bestimmung, Allantoin-Bestimmung und Bewertung der Enzym-Eigenatmung gelten auch für die vorliegende Arbeit.

Für die NH<sub>3</sub>-Bestimmungen dient eine Spezialapparatur, die aus einem mit Capillartropftrichter versehenen Mikro-Kjeldahl-Kolben, von dem seitlich ein weites U-förmig gekrümmtes Ableitungsrohr abzweigt, das am unteren Ende durch Schliff mit einem 50-cm-Rundkolben verbunden ist<sup>18)</sup>. Zum Austreiben des NH<sub>3</sub> aus der Versuchs-Lösung dient ein Boratpuffer, der im l 94 g Borax und 17 g Natriumhydroxyd p.a. enthält, zur Absorption des NH<sub>3</sub> n/50 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Nach Evakuierung der Apparatur durch den Tropftrichter werden durch diesen vorsichtig 2 ccm Boratpuffer zu der im Kjeldahl-Kolben befindlichen Reaktions-Lösung gegeben. Der Kjeldahl-Kolben wird hierauf 5 Min. in ein Wasserbad von 50–55°, die Schliff-Vorlage in Eiswasser eingetaucht. Vom Destillat wird ein aliquoter Teil mit Nessler's Reagens analysiert, so daß die colorimetrisch zu bestimmende NH<sub>3</sub>-Menge nicht über 1.5 mg liegt. Kontroll-Bestimmungen an m/50 NH<sub>4</sub>Cl lieferten 90–100% NH<sub>3</sub>.

Präparate: Allantoin<sup>19)</sup> und Uroxansäure<sup>20)</sup> wurden nach bewährten Literaturangaben durch Permanganat-Oxydation von Harnsäure, Kaliumoxonat<sup>15)</sup> durch Autoxydation von Harnsäure in alkal. Lösung, Allantoinsäure<sup>21)</sup> durch Alkalispaltung von Allantoin dargestellt.

Hrn. cand. rer. nat. H. Frehse sind wir für die Darstellung dieser Präparate zu Dank verpflichtet.

<sup>18)</sup> Beschreibung mit Abbild. in F. C. Koch u. M. E. Hanke, Practical methods in biochemistry, S. 253 (Baltimore 1948). A

<sup>19)</sup> Org. Syntheses, Collect. Vol. II, S. 21 (New York 1943). B

<sup>20)</sup> H. Blitz u. R. Robl, B. 53, 1950 [1920]. V

<sup>21)</sup> R. Behrend u. R. Schultz, A. 365, 21 [1909]. H