

Das Gemisch von Ferment, Inhibitor und Substrat wurde immer auf 10 cm<sup>3</sup> verdünnt. Die Versuchsansätze wurden dann mit 1 cm<sup>3</sup> Brom-thymolblau-Lösung (0,08-proz. in Wasser) versetzt und durch Zugabe von 0,005-n. Natronlauge auf p<sub>H</sub> 6,0—7,6 gehalten. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle veranschaulicht:

Nr.	Ferment cm <sup>3</sup>	Inhibi- tor	Substrat mg	Proz. der abgespalt. CH <sub>3</sub> COOH nach				
				15'	30'	60'	90'	1035'
a) Vergleich mit Acetyl-cholin-chlorid (ACh)								
1	PSI 0,5	—	ASCh 10	1,8	7,4	13,8	19,4	—
2	—	—	ASCh 10	0	0	0	0	—
3	PSI 0,5	—	ACh 10	8,3	21,3	34,8	47,3	—
4	—	—	ACh 10	0	0	0	0	—
5	PSI 0,5	—	ASCh 20	2,3	4,8	—	10,8	—
6	PSI 0,5	—	ACh 20	4,8	11,8	—	25,7	—
b) Die Inhibitorwirkung des Physostigmins auf Pferdeserum-Cholin-esterase								
7	PSII 0,1	—	ASCh 10	1,0	2,3	4,6	6,9	24,9
8	PSII 0,1	+	ASCh 10	0	0	0	0	0
9	PSII 0,5	—	ASCh 10	3,7	14,4	21,8	29,2	54,8
10	PSII 0,5	+	ASCh 10	0	0	0	0	0
c) Versuche mit dem hepatopankreatischen Saft der Weinbergschnecke								
11	HP 0,1	—	ASCh 10	1,0	2,3	3,6	4,9	30,8
12	HP 0,1	+	ASCh 10	0	1,0	2,0	3,0	27,0
13	HP 0,5	—	ASCh 10	3,7	11,8	17,6	23,8	63,1
14	HP 0,5	+	ASCh 10	2,8	9,7	15,7	21,3	60,2

Laboratorium für organische Chemie der Technischen Fakultät,  
Universität, Zagreb, und Laboratorium für organische Chemie  
der ETH Zürich.

## 98. Über den Abbau von *d*-Aminosäuren durch *d*-Aminosäure-oxydase von P. Karrer, H. Koenig und R. Appenzeller.

(26. VI. 42).

Vor einiger Zeit hat der eine von uns mit *H. Frank*<sup>1)</sup> das Verhalten verschiedener *d*-Aminosäuren gegen *d*-Aminosäure-oxydase untersucht, die aus reinem Lactoflavin-adenin-dinucleotid<sup>2)</sup> und dem spezifischen Protein aus Hammelnieren<sup>2)</sup> künstlich zusammengestellt worden war (im Folgenden als „rekonstruiertes“ Ferment

<sup>1)</sup> Helv. 23, 948 (1940).

<sup>2)</sup> Warburg und Christian, Bioch. Z. 298, 150 (1938).

bezeichnet). Dabei war festgestellt worden, dass jenes *d*-Aminosäure-oxydase-Präparat viele *d*-Aminosäuren mit stark verschiedener Schnelligkeit desaminiert, dass aber andere Aminosäuren nicht oder kaum angegriffen wurden. Zu der letzteren Gruppe gehörten *d,l*-Dioxy-phenylalanin, *d,l*-Histidin, *d,l*-Arginin, *d,l*-Serin,  $\beta$ -Alanin, *d,l*-Asparaginsäure und *d,l*-Glutaminsäure. An diese experimentellen Ergebnisse war schliesslich die Folgerung angeschlossen worden, „dass wenn durch Gewebschnitte und Organ-Rohextrakte sämtliche *d*-Aminosäuren desaminiert werden können, hier wahrscheinlich verschiedene Fermente am Werk sind.“

Diese Untersuchungsergebnisse erfuhren von zwei Seiten eine gewisse Kritik. *J. Raymond Klein* und *Philip Handler*<sup>1)</sup>, die unsere Versuche wiederholten, konnten zwar bestätigen, dass von den vorgenannten Aminosäuren *d*-Glutaminsäure und  $\beta$ -Alanin durch das „rekonstruierte“ *d*-Aminosäure-oxydase-Ferment nicht angegriffen werden, ebensowenig Glykokoll, Cystin und Lysin; dagegen fanden sie, dass *d*-Histidin, *d*-Asparaginsäure, *d*-Arginin und *d*-Serin dem Abbau unterliegen, wenn auch nur in sehr geringem Grad. Die genannten Forscher verwendeten eine Proteinkomponente aus Schweinenieren (statt Hammelnieren) und es ist nicht ausgeschlossen, dass dieser Umstand bei den etwas differierenden Versuchsergebnissen eine Rolle spielt. Aber selbst wenn man diesen Faktor ausser acht lässt, scheinen uns auch die Versuchsergebnisse von *Klein* und *Handler* für eine Sonderstellung der Aminosäuren *d*-Histidin, *d*-Asparaginsäure, *d*-Arginin und *d*-Serin gegenüber dem „rekonstruierten“ Ferment zu sprechen.

Die Forscher verglichen den Grad des Abbaus vieler *d*-Aminosäuren durch rohe, *d*-Aminosäure-oxydase enthaltende Extrakte mit demjenigen, der unter dem Einfluss des „rekonstruierten“ Ferments vor sich geht. Aus ihren Versuchen ergibt sich, dass jene *d*-Aminosäuren, die wir seinerzeit als durch das „rekonstruierte“ Ferment leicht abbaubar bezeichnet hatten, sowohl durch dieses wie durch die Ferment-Rohextrakte ungefähr gleich schnell und gleich vollständig abgebaut wurden; die Desaminierung von *d*-Histidin, *d,l*-Arginin, *d,l*-Asparaginsäure und *d,l*-Serin erfolgte dagegen durch das „rekonstruierte“ Ferment nur in geringem Umfang, während Ferment-Rohextrakte eine weitgehende bis vollständige Desaminierung herbeiführten.

Bei den vier erstgenannten, gegen das rekonstruierte Ferment widerstandsfähigen Aminosäuren war ausserdem nach den Befunden von *Klein* und *Handler* beim Desaminierungsversuch die Bildung von Kohlendioxyd erheblich geringer als nach der Sauerstoffaufnahme hätte erwartet werden sollen (meistens nur 10 % des theoretischen Wertes).

<sup>1)</sup> J. Biol. Chem. 139, 103 (1941).

	Abbau durch	
	Roh-Ferment	Rekonstruiertes Ferment
d-Histidin . . . . .	32%	16%
d, l-Asparaginsäure . . .	93%	24%
d, l-Arginin . . . . .	37%	19%
d, l-Serin . . . . .	97%	18%
d-Alanin . . . . .	94%	94%
d-Leucin . . . . .	93%	87%
d-Isoleucin . . . . .	105%	94%
d, l-Methionin . . . . .	97%	90%
d, l-Prolin . . . . .	98%	89%
d-Phenylalanin . . . . .	85%	87%

Man müsste u. E. aus diesen Versuchen die Schlussfolgerung ziehen, dass in den Roh-Fermentextrakten ein für die Desaminierung der vier erstgenannten Aminosäuren notwendiger Faktor vorkommt, der im „rekonstruierten“ Ferment nicht oder in ungenügenden Mengen enthalten ist, während Rohextrakte aus Nieren und „rekonstruiertes“ Ferment die zweite Gruppe der Aminosäuren (*d*-Alanin bis *d*-Phenylalanin) mit gleicher Wirkung umsetzen, somit in dem „rekonstruierten“ Ferment kein für den Abbau dieser Aminosäuren notwendiger Faktor fehlt.

Der zweite Einwand gegen unsere früheren Versuchsergebnisse wurde von *Peter Holtz* und *Hans Büchsel*<sup>1)</sup> vorgebracht. Diese Autoren verwendeten als *d*-Aminosäure-oxydase rohen Hammelnierenextrakt und verglichen den Abbau von *d, l*-Alanin und *d, l*-Dioxy-phenylalanin mit der Mischung dieser beiden Aminosäuren. Dabei stellten sie fest, dass die beiden Aminosäuren, wenn sie in Mischung vorliegen, um die Beschlagnahme der vorhandenen Fermentmenge konkurrieren, d. h. der Abbau der Mischung ergab einen Mittelwert zwischen demjenigen des schneller dehydrierbaren Alanins und des langsamer dehydrierbaren *d, l*-Dioxy-phenylalanins. Daraus wurde geschlossen, dass die verschiedenen Aminosäuren durch dasselbe Ferment abgebaut werden. Uns scheint, dass diese Schlussfolgerung nur dann statthaft ist, wenn man unter „verschiedenartigen“ Fermenten solche versteht, die keine Komponente gemeinsam haben. Wenn z. B. zum Abbau des Alanins das Fermentsystem A notwendig ist, Dioxy-phenylalanin aber nur durch Ferment A angegriffen wird, wenn es durch ein Komplement B ergänzt ist, oder wenn die beiden Fermente aus demselben Coferment, aber verschiedenen Apofermenten bestehen würden, könnte bei der Mischung der beiden Aminosäuren ebenfalls keine Summation der Abbauwerte eintreten. In solchen Fällen wäre man

<sup>1)</sup> Z. physiol. Ch. 272, 201 (1942).

aber doch berechtigt, von einer Verschiedenartigkeit der Ferment-systeme zu sprechen.

Wir haben daher unsere früheren Untersuchungen wieder aufgenommen und berichten im Folgenden über die weiteren Ergebnisse.

Zunächst wurden die in Diskussion stehenden Aminosäuren *d,l*-Asparaginsäure, *d,l*-Histidin, *d,l*-Dioxy-phenylalanin und *d,l*-Serin (*d,l*-Arginin stand uns nicht zur Verfügung) nochmals der Einwirkung der „rekonstruierten“ *d*-Aminosäure-oxydase unterworfen, wobei die Dehydrierung stets durch die Sauerstoffabsorption zur Messung kam. Als Vergleichssubstanz diente das leicht oxydierbare *d,l*-Alanin.

Die neuen Versuchsergebnisse decken sich — mit einer Ausnahme — mit den früheren. *d,l*-Asparaginsäure, *d,l*-Histidin und *d,l*-Dioxy-phenylalanin verbrauchten innerhalb 50 Minuten unter der Einwirkung des „rekonstruierten“ Ferments praktisch keinen Sauerstoff<sup>1)</sup>; nur *d,l*-Serin wurde durch das „rekonstruierte“ Ferment — im Gegensatz zu den früheren Versuchen<sup>2)</sup> — von den neuen Fermentlösungen merklich dehydriert. Es ist zu vermuten, dass die Abweichung zwischen den früheren und neueren Versuchen bezüglich des Serins auf eine Änderung in der Zusammensetzung der Proteinlösung (Apoferment) beruht.

Tabelle 1.

Versuchstemperatur: 38°.

Im Hauptraum: 2 cm<sup>3</sup> Proteinlösung B (nach Warburg),

0,5 cm<sup>3</sup> Lösung der prosthetischen Gruppe in Wasser = 10 γ,

8 Tropfen einer 10-proz. Lösung der Aminosäure in Phosphatpuffer  
p<sub>H</sub> 8,3.

Im Ansatz: 5 Tropfen 20-proz. KOH.

Im Gasraum: Luft,

Schliessen der Hahnen nach 10 Minuten.

	O <sub>2</sub> -Aufnahme in mm <sup>3</sup>				
	10 Min.	20 Min.	30 Min.	40 Min.	50 Min.
<i>d,l</i> -Alanin . . . . .	15	33	47	57	72
<i>d,l</i> -Asparaginsäure . . .	0	1	0	0	0
<i>d,l</i> -Histidin . . . . .	4	6	7	7	6
<i>d,l</i> -Dioxy-phenylalanin .	0	1	0	0	0
<i>d,l</i> -Serin . . . . .	4	15	25	33	37

<sup>1)</sup> Die Blindwerte für das Ferment und beim Dioxy-phenylalanin auch für die nicht fermentativ bedingte Autoxydation müssen selbstverständlich berücksichtigt werden. Wir arbeiteten bei jeder Versuchsreihe mit mehreren „Blindversuchen“ und nahmen das Mittel dieser „Blindwerte“ zur Korrektur der Versuchsergebnisse. Die Grösse dieser Blindwerte hängt wesentlich von der verwendeten Proteinlösung ab; sie sind im allgemeinen bei frischen Apofermentlösungen am kleinsten. Für genaue Messungen ist es unerlässlich, bei jeder neuen Versuchsserie den Blindwert der Sauerstoffabsorption neu zu bestimmen. In allen folgenden Tabellen sind diese Blindwerte bereits abgezogen.

<sup>2)</sup> Helv. **23**, 948 (1940).

Während sich nach diesen Versuchen Asparaginsäure somit weitgehend stabil gegenüber dem „rekonstruierten“ Ferment erweist, können wir bestätigen, dass sie durch Rohextrakte aus Nierenpulver dehydriert wird, allerdings beträchtlich weniger schnell als Alanin; ähnlich verhält sich *d,l*-Histidin, dessen Abbau gegenüber demjenigen des Alanins ebenfalls herabgesetzt ist:

Tabelle 2.

Versuchstemperatur: 38°.

Im Hauptraum: 1,0 cm<sup>3</sup> Rohextrakt aus Hammelnieren-Trockenpulver,  
20 mg Aminosäure in 2,0 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer p<sub>H</sub> = 7,4.

Im Ansatz: 5 Tropfen 20-proz. KOH.

Im Gasraum: Luft.

Schliessen der Hahnen nach 10 Minuten.

	O <sub>2</sub> -Aufnahme in mm <sup>3</sup>				
	10 Min.	20 Min.	30 Min.	40 Min.	50 Min.
<i>d,l</i> -Alanin . . . . .	14	30	44	54	64
<i>d,l</i> -Asparaginsäure . . . . .	2	8	12	17	21
<i>d,l</i> -Histidin . . . . .	3	6	9	11	13

Das unterschiedliche Verhalten der *d,l*-Asparaginsäure gegen Rohferment und „rekonstruierte“ *d*-Aminosäure-oxydase geht auch aus folgenden Parallelversuchen hervor:

Tabelle 2 a.

Versuchstemperatur: 38°.

Im Hauptraum: 20 mg Aminosäure.

2,0 cm<sup>3</sup> Rohextrakt oder 2,0 cm<sup>3</sup> Proteinlösung B nach Warburg und 10 γ Lactoflavin-adenin-dinucleotid, mit Phosphatpuffer (p<sub>H</sub> = 7,4) ergänzt auf 3 cm<sup>3</sup>.

Im Ansatz: 5 Tropfen 20-proz. KOH.

Im Gasraum: Luft.

	O <sub>2</sub> -Aufnahme in mm <sup>3</sup>				
	10 Min.	20 Min.	30 Min.	40 Min.	50 Min.
20 mg <i>d</i> -Alanin . . . . .	13	26	37	50	63
Ferment: Rohextrakt					
20 mg <i>d,l</i> -Asparaginsäure . . . . .	0	7	14	18	23
Ferment: Rohextrakt					
20 mg <i>d,l</i> -Asparaginsäure . . . . .	0	0	1	2	3
Ferment: „rekonstruiertes“ Ferment					
20 mg <i>d,l</i> -Asparaginsäure . . . . .	0	0	1	2	3
Ferment: „rekonstruiertes“ Ferment					

Wenn im Sinn der Auffassung von Holtz und Büchsel Aminosäuren, die in Mischung vorliegen, um die Aminosäure-dehydrase ein-

fach konkurrieren, so wäre anzunehmen, dass Mischungen aus dem schnell abbaubaren Alanin und den schwerer dehydrierbaren Aminosäuren *d,l*-Asparaginsäure und *d,l*-Histidin eine mittlere Dehydrierbarkeit zeigen würden. Die folgenden Versuchsergebnisse stehen damit jedoch nicht in Einklang.

Tabelle 3.

Versuchstemperatur: 38°.

Im Hauptraum: 2,0 cm<sup>3</sup> Rohextrakt aus Hammelnieren-Trockenpulver. Wechselnde Mengen (10—30 mg) Aminosäure in 1 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer p<sub>H</sub> = 7,4.

Im Ansatz: 6 Tropfen 30-proz. KOH.

Im Gasraum: Luft.

Schliessen der Hahnen nach 10 Minuten.

	O <sub>2</sub> -Aufnahme in mm <sup>3</sup>				
	10 Min.	20 Min.	30 Min.	40 Min.	50 Min.
10 mg <i>d</i> -Alanin . . . . .	5	20	34	54	70
20 mg <i>d</i> -Alanin . . . . .	13	27	45	70	85
30 mg <i>d</i> -Alanin . . . . .	11	28	45	69	86
10 mg <i>d,l</i> -Asparaginsäure . . . . .	8	15	21	29	36
20 mg <i>d,l</i> -Asparaginsäure . . . . .	10	17	24	32	39
30 mg <i>d,l</i> -Asparaginsäure . . . . .	9	18	24	33	40

Tabelle 4.

Versuchsanordnung wie in Tabelle 3.

	O <sub>2</sub> -Aufnahme in mm <sup>3</sup>				
	10 Min.	20 Min.	30 Min.	40 Min.	50 Min.
20 mg <i>d</i> -Alanin . . . . .	13	24	37	50	63
20 mg <i>d,l</i> -Asparaginsäure . . . . .	0	7	14	18	23
20 mg <i>d</i> -Alanin und 20 mg <i>d,l</i> -Asparaginsäure . . . . .	18	31	45	60	71
20 mg <i>d</i> -Alanin und 20 mg <i>d,l</i> -Asparaginsäure . . . . .	15	28	41	54	64

Tabelle 5.

Versuchsanordnung wie in Tabelle 3.

	O <sub>2</sub> -Aufnahme in mm <sup>3</sup>				
	10 Min.	20 Min.	30 Min.	40 Min.	50 Min.
20 mg <i>d</i> -Alanin . . . . .	12	30	42	52	62
20 mg <i>d,l</i> -Asparaginsäure . . . . .	0	9	10	15	19
20 mg <i>d</i> -Alanin und 20 mg <i>d,l</i> -Asparaginsäure . . . . .	9	23	31	44	60
20 mg <i>d</i> -Alanin und 20 mg <i>d,l</i> -Asparaginsäure . . . . .	13	32	45	69	85

Tabelle 6.

Versuchsanordnung wie in Tabelle 5.

	O <sub>2</sub> -Aufnahme in mm <sup>3</sup>				
	10 Min.	20 Min.	30 Min.	40 Min.	50 Min.
20 mg <i>d</i> -Alanin . . . . .	12	22	36	50	60
20 mg <i>d</i> -Alanin . . . . .	9	21	35	49	58
20 mg <i>d,l</i> -Histidin . . . . .	3	6	9	11	13
20 mg <i>d</i> -Alanin und 20 mg <i>d,l</i> -Histidin	12	22	36	49	58
20 mg <i>d</i> -Alanin und 20 mg <i>d,l</i> -Histidin	13	23	37	52	61

Tabelle 7.

Versuchsanordnung wie in Tabelle 3.

	O <sub>2</sub> -Aufnahme in mm <sup>3</sup>				
	10 Min.	20 Min.	30 Min.	40 Min.	50 Min.
20 mg <i>d</i> -Alanin . . . . .	14	32	55	72	89
20 mg <i>d</i> -Alanin . . . . .	13	32	54	71	89
20 mg <i>d</i> -Alanin und 20 mg <i>d,l</i> -Histidin	17	37	59	78	94
20 mg <i>d</i> -Alanin und 20 mg <i>d,l</i> -Histidin	18	40	63	83	102

Die in den Tabellen 3—7 wiedergegebenen Versuchsergebnisse lassen erkennen, dass bei der Einwirkung der rohen Extrakte von *d*-Aminosäure-oxydase (aus Hammelnieren) auf Mischungen des leicht angreifbaren *d*-Alanins und mit den schwerer abbaubaren Aminosäuren *d,l*-Asparaginsäure und *d,l*-Histidin nicht eine nachweisbare Aufteilung des Ferments an die beiden Aminosäuren eintritt. Der Abbau der Mischung war gegenüber demjenigen des Alanins nicht verzögert, mehrfach sogar etwas erhöht. Da auch bei genauerer Innehaltung der Versuchsbedingungen kleinere Streuungen in den Versuchsergebnissen auftreten, wollen wir auf die öfters etwas erhöhten Abbauwerte der Aminosäuremischungen gegenüber jenen des reinen *d,l*-Alanins keinen besonderen Nachdruck legen. Dagegen lässt sich nicht bestreiten, dass der Abbau in der Mischung *d*-Alanin + *d*-Asparaginsäure bzw. *d*-Alanin + *d*-Histidin so erfolgt, als ob das leicht abbaubare *d*-Alanin das ganze Ferment mit Beschlag belegte; ob ein langsamer Abbau der Asparaginsäure noch daneben hergeht, lassen wir aus den eben erörterten Gründen dahingestellt.

Schliesslich haben wir noch geprüft, ob die Dehydrierung von *d,l*-Alanin und *d,l*-Asparaginsäure durch die rohe Aminosäureoxydase gesteigert wird, wenn man dem Rohferment-Extrakt einmal die reine prosthetische Gruppe (Lactoflavin-adenin-dinucleotid), ein anderes Mal das Apoferment (Proteinlösung B nach Warburg) zusetzt. Dies war indessen in sicher nachweisbarem Ausmass nicht der Fall. Auch eine Mischung von *d,l*-Alanin und *d,l*-Asparaginsäure wird durch das

Rohferment nicht schneller dehydriert, wenn man gleichzeitig reines Coferment zufügt. Daraus ist die Schlussfolgerung zu ziehen, dass eine allfällige Verschiedenheit der die beiden genannten Aminosäuren oxydierenden Fermente nicht darauf beruhen kann, dass sie sich aus derselben prosthetischen Gruppe aber verschiedenen Apofermenten zusammensetzen.

Tabelle 8.

Versuchstemperatur: 38°.

Im Hauptaum: 1 cm<sup>3</sup> Rohextrakt aus Schweinenieren,

40 mg Aminosäure in 3,0 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer p<sub>H</sub> = 8,3.

Ev. 10 γ Lactoflavin-adenin-dinucleotid in Wasser,  
ergänzt durch Puffer auf 5,5 cm<sup>3</sup>.

Im Ansatz: 7 Tropfen 40-proz. Kalilauge.

Im Gasraum: Luft.

	O <sub>2</sub> -Aufnahme in mm <sup>3</sup>					
	10 Min.	20 Min.	30 Min.	40 Min.	60 Min.	120 Min.
40 mg <i>d,l</i> -Alanin + 40 mg <i>d,l</i> -Asparaginsäure + 10 γ gelbes Ferment . . . . .	3	9	16	21	31	61
40 mg <i>d,l</i> -Alanin + 40 mg <i>d,l</i> -Asparaginsäure + 10 γ gelbes Ferment . . . . .	4	11	17	23	33	66
40 mg <i>d,l</i> -Alanin + 40 mg <i>d,l</i> -Asparaginsäure . . . . .	2	8	16	21	33	73
40 mg <i>d,l</i> -Alanin + 10 γ gelbes Ferment . . . . .	3	11	19	25	38	72
40 mg <i>d,l</i> -Alanin + 10 γ gelbes Ferment . . . . .	2	9	17	22	33	68

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

## 99. Über Gallensäuren und verwandte Stoffe.

16. Mitteilung<sup>1)</sup>.

### 3α,12α-Dioxy-cholansäure (12-*epi*-Desoxycholsäure)

von B. Koechlin und T. Reichstein.

(26. VI. 42.)

S. Kishi<sup>2)</sup> isolierte aus Kaninchengalle eine krystallisierte Säure vom Smp. 156°, die er α-Lago-desoxycholsäure nannte. Sie soll sich von der bekannten Desoxycholsäure, die wir aus den weiter unten zu erwähnenden Gründen als 3α,12β-Dioxy-cholansäure bezeichnen und entsprechend (I) formulieren, nur durch Epimerie in 12-Stellung

<sup>1)</sup> 15. Mitteilung vgl. J. Press, T. Reichstein, Helv. **25**, 878 (1942).

<sup>2)</sup> S. Kishi, Z. physiol. Ch. **238**, 210 (1936).