

1,5 g Ni-Al-Legierung versetzt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf  $30\text{ cm}^3$  aufgefüllt. Wie oben hydriert. Getrocknetes Rohprodukt (5 g) in wenig abs. Pyridin gelöst, mit Sorbit-Pyridin-Verbindung<sup>1)</sup> angeimpft, 2 Std., zuletzt bei  $0^\circ$  krystallisieren gelassen. Abgenutscht, mit wenig abs. Pyridin gewaschen, 3,26 g Krystalle entspr. 2,227 g Sorbit. Das Filtrat mit  $15\text{ cm}^3$  Acetanhydrid versetzt, wie oben erwärmt u. aufgearbeitet gab 6,5 g rohes *l*-Idit-hexa-acetat. 3mal aus Äther-Petroläther umkrystallisiert, 4,6 g farblose Blättchen, Smp.  $119,5\text{--}120,5^\circ$ <sup>2)</sup>. *l*-Sorbit-hexa-acetat schmilzt bei  $96,5\text{--}97,5^\circ$ <sup>4)</sup>.

Die Mikroanalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der Eidgen. Techn. Hochschule, Zürich (Leitung W. Manser) ausgeführt.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

## 22. Zur Kenntnis des Abbaues der Aminosäuren im tierischen Organismus

### 9. Weitere Mitteilungen über Effektoren der *d*-Aminosäure-oxydase

von S. Edlbacher, O. Wiss und A. Walser.

(20. XII. 45.)

In früheren Mitteilungen wurde gezeigt<sup>5)6)</sup>, dass der aus Apoferment und Coferment bestehende Symplex der *d*-Aminosäure-oxydase mit den verschiedensten Aminosäuren und Proteinen in Komplexe übergehen kann, wobei jedesmal eine neue Variante der *d*-Aminosäure-oxydase entsteht. Seit den grundlegenden Arbeiten von O. Warburg spielt die Blausäure als Hemmkörper zur Charakterisierung von Enzymen eine entscheidende Rolle. Nach O. Warburg<sup>7)</sup> hemmt die Blausäure die Cytochromoxydase durch Bildung einer Komplexverbindung mit dem dreiwertigen Hämineisen.

Weiterhin hat H. A. Krebs<sup>8)</sup> die von ihm entdeckte *d*-Aminosäure-oxydase unter andern durch ihr Verhalten gegenüber Blausäure von der *l*-Aminosäure-oxydase abtrennen können. Es zeigte sich nämlich, dass die *l*-Aminosäure-oxydase durch Cyanion weitgehend gehemmt wird, während die *d*-Aminosäure-oxydase nicht beeinflusst wird.

Die Charakterisierung der *l*-Aminosäure-oxydase geschah jedoch lediglich am Beispiel des *l*-Asparaginsäure- und des *l*-Valin-Abbaues an Rattennierenschnitten. In ausführlichen Untersuchungen haben deshalb Edlbacher und Grauer<sup>9)</sup> die Hemmbarkeit des oxydativen

<sup>1)</sup> H. H. Strain, Am. Soc. **56**, 1756 (1934).

<sup>2)</sup> G. Bertrand, Bl. [3] **33**, 166 (1905).

<sup>3)</sup> G. Bertrand, A. Lanzenberg, Bl. [3] **35**, 1073 (1906).

<sup>4)</sup> C. Vincent, Delachanal, C. r. **108**, 355; **109**, 676 (1889).

<sup>5)</sup> Helv. **28**, 797 (1945).

<sup>7)</sup> Bioch. Z. **189**, 354 (1927).

<sup>6)</sup> Helv. **28**, 1111 (1945).

<sup>8)</sup> Biochem. J. **29**, 1620 (1935).

<sup>9)</sup> Helv. **27**, 928 und 1511 (1944).

Abbaues zahlreicher anderer *l*-Aminosäuren untersucht. Durch systematische Anwendung einer grossen Anzahl der verschiedenartigsten Hemmkörper liess sich so die *l*-Aminosäure-oxydase in weitere Einzelenzyme unterteilen.

Es ist auch bekannt, dass eine Reihe von enzymatischen Reaktionen durch Blausäure aktivierbar sind. Über den Mechanismus der Aktivierung ist wenig Sicheres bekannt.

Im Falle der Papainaktivierung wird von *Grassmann*<sup>1)</sup> angenommen, dass Disulfidgruppen des Enzyms oder Substrats durch Cyanwasserstoff in Sulfhydrylgruppen übergeführt werden. *Mayr* und *Borger*<sup>2)</sup> erklären die Cyanaktivierung des Kathepsins in ähnlicher Weise. Nach *Tauber*<sup>3)</sup> soll die Carboxylase-Aktivierung durch Bildung eines reaktionsfähigen Cyanhydrins mit der Brenztraubensäure erfolgen. Schliesslich ist im Falle der Urease<sup>4) 5)</sup> auch die Möglichkeit erwogen worden, dass durch Blausäure die Hemmungswirkung von Schwermetallen eliminiert wird.

In den folgenden Untersuchungen haben wir die Wirkung von Blausäure auf die gereinigte *d*-Aminosäure-oxydase untersucht. Es liess sich nachweisen, dass sich der *d*-Aminosäure-Abbau durch Blausäure in eminentem Ausmass aktivieren lässt. In Analogie zu der Effektorenwirkung der Aminosäuren und Proteine konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung vor allem bei Verwendung von kleinen Enzymkonzentrationen in Erscheinung tritt, und dass das Ausmass der Aktivierung vom Reinheitsgrad des Ferment-Proteins abhängig ist. Es gelingt so, durch 0,001-m. Blausäure den Abbau von *d*-Alanin auf das ca. Hundertfache zu aktivieren. In der 6. Mitteilung dieser Reihe<sup>6)</sup> liess sich nachweisen, dass durch gereinigte *d*-Aminosäure-oxydase wohl alle Typen der *d*-Aminosäuren abgebaut werden, dass sich aber zwei Gruppen unterscheiden lassen, insofern sich nur der Abbau der Mono-aminomonocarbonsäuren durch Aminosäuren und Proteine aktivieren lässt. Es zeigte sich nun, dass Blausäure in ganz analoger Weise wirkt.

Als zweiten Effektor haben wir das Pyrophosphat in den Kreis der Untersuchungen gezogen. *Krebs* (l. c.) hat in seinen Untersuchungen über die *d*-Aminosäure-oxydase vorwiegend mit Phosphatpuffer  $p_H = 7,4$  gearbeitet. *Warburg*<sup>7)</sup> hingegen verwendete ausschliesslich Pyrophosphat als Puffer. Er hat anscheinend das Phosphat durch Pyrophosphat ersetzt, um bei optimalem  $p_H$  unter-

<sup>1)</sup> Z. angew. Ch. **44**, 105 (1931).

<sup>2)</sup> Bioch. Z. **273**, 56 (1934).

<sup>3)</sup> J. Biol. Chem. **125**, 191 (1938).

<sup>4)</sup> *Hellermann* und Mitarbeiter: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **19**, 855 (1933).

<sup>5)</sup> *Bersin* und *Köster*, Z. Naturwiss. **1**, 230 (1935).

<sup>6)</sup> Helv. **28**, 797 (1945).

<sup>7)</sup> Bioch. Z. **298**, 150 (1938).

suchen zu können. Es liegen jedoch keine Untersuchungen über die Effektorenwirkung von Pyrophosphat auf die *d*-Aminosäure-oxydase vor. Wir konnten nun nachweisen, dass Pyrophosphat ähnlich wie Blausäure den Abbau der *d*-Aminosäuren beeinflusst. Auch in diesem Falle ist die Aktivierbarkeit in typischer Weise an den Reinheitsgrad des Fermentproteins und an die Enzymkonzentration gebunden. Es liess sich wiederum zeigen, dass im wesentlichen nur der Abbau der Mono-aminomonocarbonsäuren aktiviert wird. In weiteren Untersuchungen hat sich das Semicarbazid als kräftiger Hemmkörper der gereinigten *d*-Aminosäure-oxydase erwiesen.

*Krebs* (l. c.) hat die *d*-Aminosäure-oxydase weiterhin durch ihr Verhalten gegenüber Octylalkohol charakterisiert. So hat er nachweisen können, dass der Abbau von *l*-Asparaginsäure bei Verwendung von nativen Rattennieren-Präparaten durch Octylalkohol gehemmt wird, während der *d*-Valin-Abbau nicht beeinflusst wird. Wir konnten diese Ergebnisse durchaus bestätigen. Die Erweiterung dieser Untersuchungen auf andere Aminosäuren und andere Enzympräparate zeigte jedoch, dass sich der *d*-Aminosäureabbau unter anderen Versuchsbedingungen durch Octylalkohol zum Teil sehr kräftig hemmen lässt.

## Experimenteller Teil.

### 1. Methoden.

Die Versuchstechnik findet sich in den vorangegangenen Mitteilungen (l. c.) beschrieben. Das in der 8. Mitteilung als Apoferment angegebene Präparat A wurde nach *Negelein* und *Brömel*<sup>1)</sup> in verdünnter Pyrophosphat-Lösung extrahiert und das wirksame Fermentprotein bei  $p_H = 5,1$  gefällt. Das Trockenpräparat dieser Reinigungsstufe (= Präparat c) blieb während einiger Wochen aktiv. Als Coferment diente durch Phenolextraktion gereinigter Hefekochsaft. Auf je 10 mg des Trockenpräparates wurde 0,15 cm<sup>3</sup> Hefe-Extrakt zugegeben. Zur Messung des Sauerstoffverbrauches und der Ammoniakbildung verwendeten wir die Methoden nach *Warburg* und *Conway*, wie wir sie in den früheren Mitteilungen beschrieben haben. Das Gesamtflüssigkeits-Volumen betrug in allen Fällen 3 cm<sup>3</sup>. Für alle Versuche verwendeten wir Phosphatpuffer  $p_H = 8$ . Bei allen Versuchen mit Blausäure wurde das von *Krebs* angegebene Gemisch von Kaliumcyanid und Kaliumhydroxyd in den Einsatz des *Warburg*-Gefässes gegeben.

Die Bereitung des Nierenhackbreies findet sich in der 3. Mitteilung beschrieben<sup>2)</sup>.

### 2. Aktivierung der oxydativen Desaminierung von *d*-Alanin durch Blausäure.

Aus den folgenden Versuchen (Tabelle 1) geht hervor, dass der oxydative Abbau des *d*-Alanins durch Blausäure bei Verwendung von Reinenzym enorm gesteigert wird. Die Aktivierung tritt am deutlichsten in kleinen Enzymkonzentrationen in Erscheinung. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, wirkt Cyanwasserstoff in 0,001-m. Konzentration optimal. Dass es sich tatsächlich um eine oxydative Desaminierung handelt, ist aus dem Verhältnis Sauerstoff : Ammoniak, das dem errechneten Wert 1 : 2 entspricht, klar ersichtlich.

<sup>1)</sup> Bioch. Z. **300**, 225 (1939).

<sup>2)</sup> Helv. **27**, 1060 (1944).

Tabelle 1.

Aktivierung des *d*-Alanin-Abbaues durch Blausäure.

A

Versuchsdauer 1 Stunde.

Enzym mg	<i>d</i> -Alanin Mol	KCN Mol	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Verbrauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Verbrauch durch Aktivierung bedingt
1,5	m/50		13	
1,5	m/50	m/1000	294	+ 281

B

Versuchsdauer 1 Stunde.

En- zym mg	<i>d</i> -Alanin Mol	KCN Mol	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Ver- brauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Ver- brauch durch Akti- vierung bedingt	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung durch Akti- vierung bedingt
1,5	m/50		4		23	
1,5	m/50	m/1000	346	+ 342	678	+ 655

C

Versuchsdauer 1 Stunde.

Enzym mg	<i>d</i> -Alanin Mol	KCN Mol	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Verbrauch	abzüglich Leerwert durch Aktivierung bedingt
16	m/50		1101	
8	m/50		914	
4	m/50		686	
2	m/50		143	
1	m/50		31	
16	m/50	m/1000	1124	+ 23
8	m/50	m/1000	945	+ 31
4	m/50	m/1000	966	+ 280
2	m/50	m/1000	768	+ 625
1	m/50	m/1000	396	+ 365

D

Versuchsdauer 1 Stunde.

Enzym mg	<i>d</i> -Alanin Mol	KCN Mol	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Verbrauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Verbrauch durch Aktivierung bedingt
1	m/50		14	
1	m/50	m/100	63	+ 49
1	m/50	m/200	135	+ 121
1	m/50	m/400	227	+ 213
1	m/50	m/1000	252	+ 238
1	m/50	m/3200	212	+ 198
1	m/50	m/12800	95	+ 81

## E

Versuchsdauer 1 Stunde.

Enzym mg	<i>d</i> -Alanin Mol	KCN Mol	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Verbrauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Verbrauch durch Aktivierung bedingt
2	m/50		61	
2	m/30		83	
2	m/15		76	
2	m/50	m/1000	692	+ 631
2	m/30	m/1000	847	+ 764
2	m/15	m/1000	541	+ 465

3. Aktivierung der oxydativen Desaminierung von *d*-Alanin durch Pyrophosphat.

Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass das Pyrophosphat als kräftiger Aktivator der *d*-Aminosäure-oxydase wirken kann (Tabelle 2). Wiederum tritt der Steigerungseffekt vor allem bei Verwendung von Reinezym und bei kleinen Enzymkonzentrationen in Erscheinung. Parallel zur Steigerung des Sauerstoff-Verbrauchs lässt sich die vermehrte Ammoniakbildung nachweisen. Mit steigender Enzymkonzentration verringert sich der Aktivierungseffekt, so dass bei sehr hohen Enzymkonzentrationen der Reaktionsablauf unbeeinflusst bleibt.

Tabelle 2.

Aktivierung des *d*-Alanin-Abbaues durch Pyrophosphat.

## A

Versuchsdauer 1 Stunde.

Enzym mg	<i>d</i> -Alanin	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Verbrauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Verbrauch durch Aktivierung bedingt
1,5	m/50		19	
1,5	m/50	m/100	335	+ 316
1,5	m/50	m/1000	70	+ 51

## B

Versuchsdauer 1 Stunde.

Enzym mg	<i>d</i> -Alanin	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Ver- brauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Ver- brauch durch Ak- tivierung bedingt	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung durch Ak- tivierung bedingt
2	m/50		4		0	
2	m/50	m/100	113	+ 109	249	+ 249

## C

Versuchsdauer 1 Stunde.

Enzym mg	<i>d</i> -Alanin	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Verbrauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Verbrauch durch Aktivierung bedingt
2	m/50		61	
2	m/30		83	
2	m/15		76	
2	m/50	m/100	347	+ 286
2	m/30	m/100	533	+ 450
2	m/15	m/100	583	+ 507

## D

Enzym: 15 mg Trockenpulver/1 cm<sup>3</sup> Puffer (Präparat A).Coferment: 0,15 cm<sup>3</sup> Phenolextrakt/50 mg Pulver. Versuchsdauer: 2 Stunden.

Enzym cm <sup>3</sup>	<i>d</i> -Alanin	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Verbrauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Verbrauch durch Aktivierung bedingt
2	m/50		1224	
2	m/50	m/100	1274	+ 50
1,5	m/50		1114	
1,5	m/50	m/100	1299	+ 185
1	m/50		567	
1	m/50	m/100	1294	+ 727
0,5	m/50		62	
0,5	m/50	m/100	740	+ 678
0,25	m/50		9	
0,25	m/50	m/100	283	+ 274

4. Hemmung des oxydativen Abbaues von *d*-Alanin durch Semicarbazid.

Bemerkenswerter Weise liess sich feststellen, dass, im Gegensatz zur Blausäure, Semicarbazid die reine *d*-Aminosäure-oxydase intensiv hemmen kann.

Tabelle 3.

Hemmung des oxydativen Abbaues von *d*-Alanin durch Semicarbazid.

## A

Versuchsdauer 1 Stunde.

Enzym mg	<i>d</i> -Alanin	Semicar- bazid	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Verbrauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Verbrauch durch Akti- vierung bedingt	% Hemmung
6	m/50		578		
6	m/50	m/100	157	- 421	- 73%
6	m/50	m/500	375	- 203	- 35%
6	m/50	m/1000	502	- 76	- 13%

B  
Versuchsdauer 1 Stunde.

Enzym mg	<i>d</i> -Ala- nin	Semi- carba- zid	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Ver- brauch abzügl. Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Ver- brauch d. Hem- mung bedingt	% O <sub>2</sub> - Hem- mung	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung abzügl. Leerwert	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung d. Hem- mung bedingt	% NH <sub>3</sub> - Hem- mung
5	m/50		427			738		
5	m/50	m/100	206	- 221	- 52%	348	- 390	- 53%

5. Hemmung der *d*-Aminosäure-oxydase durch Octylalkohol.

Wir konnten die Angaben von *Krebs* bestätigen, wonach der Abbau von *l*-Asparaginsäure bei Verwendung von nativen Ratten-Nierenpräparaten durch Octylalkohol gehemmt wird, während der *d*-Valinabbau unbeeinflusst bleibt. In Erweiterung seiner Untersuchungen liess sich nun zeigen, dass einerseits der *d*-Asparaginsäureabbau bei der Ratte und beim Meerschweinchen durch Octylalkohol ebenfalls partiell gehemmt, und dass ausserdem unter geeigneten Bedingungen auch der Abbau der *d*-Mono-aminomonocarbonsäuren kräftig gehemmt wird.

Tabelle 4.  
Hemmung der oxydativen Desaminierung von Aminosäuren durch Octyl-  
alkohol.

A  
Rattennieren-Hackbrei ausgewaschen mit  $\frac{1}{3}$  Puffer versetzt  $p_H = 7,0$ .  
Versuchsdauer 1 Stunde.

Enzym cm <sup>3</sup>	<i>l</i> -Aspa- ragin- säure	<i>d</i> -Aspa- ragin- säure	Octyl- alkohol cm <sup>3</sup>	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Ver- brauch	Diffe- renz	$\gamma$ NH <sub>3</sub>	Diffe- renz	% Hem- mung
0,5				405		47		
0,5			0,015	43		41		- 13%
0,5	m/20			477	+ 72	102	+ 55	
0,5	m/20		0,015	76	+ 33	52	+ 11	- 80%
0,5		m/20		469	+ 64	73	+ 26	
0,5		m/20	0,015	52	+ 9	54	+ 13	- 50%

B  
Präparat B (vgl. 8. Mitteilung, I. c.).  
Enzym: 0,15 mg Trockenpulver/1 cm<sup>3</sup>.  
Coferment: 0,25 cm<sup>3</sup> Phenolextrakt/3 mg Pulver.  
Pyrophosphat: m/20  $p_H = 8,3$ .  
Versuchsdauer: 1 Stunde.

Enzym cm <sup>3</sup>	<i>d</i> -Alanin	Octyl- alkohol cm <sup>3</sup>	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Ver- brauch abzügl. Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Ver- brauch durch Hemmung bedingt	% Hem- mung
2	m/50		849		
2	m/50	0,015	588	- 261	- 31%
0,5	m/50		115		
0,5	m/50	0,015	44	- 71	- 62%

## 6. Gegenseitige Beeinflussung von verschiedenen Effektoren.

In Analogie zu den Untersuchungen, die wir in der 8. Mitteilung beschrieben haben, beeinflussen sich mehrere gleichzeitig zugesetzte Effektoren in sehr verschiedener Weise. Entsprechende Versuche über die Wirkung des Semicarbazids auf das aktivierte Enzym zeigen, dass das Ausmass des Hemmungseffektes je nach der Natur des Aktivators grossen Schwankungen unterliegt.

Tabelle 5.

Gegenseitige Beeinflussung von verschiedenen Effektoren.

A

Versuchsdauer 1 Stunde.

Enzym mg	<i>d</i> -Alanin	KCN	<i>l</i> -Histidin	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Verbrauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Verbrauch durch Akti- vierung bedingt	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung durch Akti- vierung bedingt
2	m/50			4		0	
2	m/50	m/1000		288	+ 284	584	+ 584
2	m/50		m/500	214	+ 210	424	+ 424
2	m/50	m/1000	m/500	254	+ 250	464	+ 464

B

Versuchsdauer 1 Stunde.

Enzym mg	<i>d</i> -Alanin	KCN	Pyrophosphat	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Verbrauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Verbrauch durch Akti- vierung bedingt	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung durch Akti- vierung bedingt
2	m/50			4		0	
2	m/50	m/1000		288	+ 284	584	+ 584
2	m/50		m/100	113	+ 109	247	+ 247
2	m/50	m/1000	m/100	255	+ 251	479	+ 479

C

Versuchsdauer 1 Stunde.

Enzym mg	<i>d</i> -Alanin	KCN	Semicarbazid	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Verbrauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Verbrauch durch Akti- vierung bedingt	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung durch Akti- vierung bedingt
2	m/50			4		0	
2	m/50	m/1000		288	+ 284	584	+ 584
2	m/50		m/100	3	- 1	58	
2	m/50	m/1000	m/100	35	+ 31	138	+ 80



## D

Versuchsdauer 1 Stunde.

Enzym mg	<i>d</i> -Ala- nin	Pyro- phos- phat	<i>l</i> -Hi- stidin	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Verbrauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Verbrauch durch Akti- vierung bedingt	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung durch Akti- vierung bedingt
2	m/50			4		0	
2	m/50	m/100		113	+ 109	247	+ 247
2	m/50		m/500	214	+ 210	424	+ 424
2	m/50	m/100	m/500	209	+ 205	427	+ 427

## E

Versuchsdauer 1 Stunde.

Enzym mg	<i>d</i> -Ala- nin	Pyro- phos- phat	Semi- car- bazid	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Verbrauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Verbrauch durch Akti- vierung bedingt	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung durch Akti- vierung bedingt
2	m/50			4		0	
2	m/50	m/100		113	+ 109	247	+ 247
2	m/50		m/100	3	- 1	58	
2	m/50	m/100	m/100	24	+ 20	153	+ 95

## F

Versuchsdauer 1 Stunde.

Enzym mg	<i>d</i> -Ala- nin	<i>l</i> -Hi- stidin	Semi- car- bazid	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Verbrauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Verbrauch durch Akti- vierung bedingt	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> NH <sub>3</sub> - Bildung durch Akti- vierung bedingt
2	m/50			4		0	
2	m/50	m/500		214	+ 210	424	+ 424
2	m/50		m/100	3	- 1	58	
2	m/50	m/500	m/100	104	+ 98	292	+ 234

7. Beeinflussung des Abbaues verschiedener *d*-Aminosäuren durch KCN und Pyrophosphat.

Die Ausdehnung der Untersuchung über die Effektorenwirkung von Kaliumcyanid und Pyrophosphat auf andere Aminosäuren hat ergeben, dass sich nur der Abbau der *d*-Mono-aminomonocarbonsäuren aktivieren lässt. Es zeigte sich dementsprechend, dass sich Cyanion und Pyrophosphat auch in dieser Beziehung den früher beschriebenen Effektoren analog verhalten<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Helv. **28**, 797 (1945).

Tabelle 6.

Aktivierung des Abbaues verschiedener Aminosäuren durch KCN und Pyrophosphat.

Versuchsdauer: 1 Stunde. Enzym: 2 mg/l cm<sup>3</sup> Puffer.

<i>d</i> -Aminosäure	Mol.	KCN	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Verbrauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Ver- brauch durch Aktivierung bedingt
<i>d</i> -Isoleucin . . . . .	m/50		18	
<i>d</i> -Alanin . . . . .	m/50		61	
<i>d</i> -Valin . . . . .	m/50		78	
<i>d</i> -Phenylalanin . . . . .	m/50		152	
<i>d</i> -Leucin . . . . .	m/50		15	
<i>d</i> -Arginin . . . . .	m/50		2	
<i>d</i> -Histidin . . . . .	m/50		7	
<i>d</i> -Asparaginsäure. . . . .	m/50		114	
<i>d</i> -Isoleucin . . . . .	m/50	m/1000	698	+ 680
<i>d</i> -Alanin . . . . .	m/50	m/1000	692	+ 631
<i>d</i> -Valin . . . . .	m/50	m/1000	487	+ 409
<i>d</i> -Phenylalanin . . . . .	m/50	m/1000	436	+ 284
<i>d</i> -Leucin . . . . .	m/50	m/1000	229	+ 214
<i>d</i> -Arginin . . . . .	m/50	m/1000	56	+ 54
<i>d</i> -Histidin . . . . .	m/50	m/1000	50	+ 43
<i>d</i> -Asparaginsäure. . . . .	m/50	m/1000	156	+ 42
		Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>		
<i>d</i> -Isoleucin . . . . .	m/50		78	
<i>d</i> -Alanin . . . . .	m/50		40	
<i>d</i> -Valin . . . . .	m/50		20	
<i>d</i> -Phenylalanin . . . . .	m/50		31	
<i>d</i> -Leucin . . . . .	m/50		18	
<i>d</i> -Arginin . . . . .	m/50		4	
<i>d</i> -Histidin . . . . .	m/50		0	
<i>d</i> -Asparaginsäure. . . . .	m/50		139	
<i>d</i> -Isoleucin . . . . .	m/50	m/100	525	+ 447
<i>d</i> -Alanin . . . . .	m/50	m/100	415	+ 375
<i>d</i> -Valin . . . . .	m/50	m/100	358	+ 338
<i>d</i> -Phenylalanin . . . . .	m/50	m/100	313	+ 282
<i>d</i> -Leucin . . . . .	m/50	m/100	170	+ 152
<i>d</i> -Arginin . . . . .	m/50	m/100	17	+ 13
<i>d</i> -Histidin . . . . .	m/50	m/100	34	+ 34
<i>d</i> -Asparaginsäure. . . . .	m/50	m/100	143	+ 4

8. Abbau von *d*-Alanin durch Rohferment.

Wie im Reiferment lässt sich auch im Rohferment zeigen, dass der Abbau von *d*-Alanin durch Cyanion und Pyrophosphat gesteigert und durch Semicarbazid gehemmt wird. Die Unterschiede sind zwar bedeutend geringer, aber doch deutlich nachweisbar.

Tabelle 7.

Aktivierung des *d*-Alanin-Abbaues durch KCN im Rohferment.

A

Enzym: 10 g Nierentrockenpulver/40 cm<sup>3</sup>, Phosphatpuffer p<sub>H</sub> = 8, 20 Minuten extrahiert.

Versuchsdauer: 10 Minuten.

Enzym cm <sup>3</sup>	<i>d</i> -Alanin	KCN	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Ver- brauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Ver- brauch durch Aktivie- rung bedingt
1,5	m/50		285	
1,5	m/50	m/25	510	+ 225
1,5	m/50	m/50	465	+ 180
1,5	m/50	m/100	403	+ 118
1,5	m/50	m/1000	319	+ 34

B

Enzym: 5 g Nierentrockenpulver/20 cm<sup>3</sup>, 20 Minuten extrahiert.

Versuchsdauer: 1 Stunde.

Enzym cm <sup>3</sup>	<i>d</i> -Alanin	KCN	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Ver- brauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Ver- brauch durch Aktivie- rung bedingt
0,05	m/100		0	
0,05	m/100	m/100	33	+ 33
0,05	m/100	m/1000	76	+ 76

Tabelle 8.

Aktivierung des *d*-Alanin-Abbaues durch Natriumpyrophosphat im Rohferment.

Enzym: 10 g Nierentrockenpulver/40 cm<sup>3</sup>, Phosphatpuffer p<sub>H</sub> = 8, 20 Minuten extrahiert.

Versuchsdauer: 10 Minuten.

Enzym cm <sup>3</sup>	<i>d</i> -Alanin	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Ver- brauch abzüglich Leerwert	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> -Ver- brauch durch Aktivie- rung bedingt
1,5	m/50		232	
1,5	m/50	m/18	326	+ 94
1,5	m/50	m/30	306	+ 74
1,5	m/50	m/60	280	+ 48
1,5	m/50	m/100	271	+ 39

Tabelle 9.

Hemmung des *d*-Alanin-Abbaues durch Semicarbazid im Rohferment  
 Enzym: 10 g Nierentrockenpulver/40 cm<sup>3</sup>, Phosphatpuffer p<sub>H</sub> = 8, 20 Minuten extrahiert.  
 Versuchsdauer: 10 Minuten.

Enzym cm <sup>3</sup>	<i>d</i> -Alanin	Semi- carbазid	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> - Verbrauch abzüglich Leerwert	% Hemmung
0,5	m/50		156	
0,5	m/50	m/30	99	– 37%

#### 9. Weitere Effektoren der *d*-Aminosäure-oxydase.

Die Versuche mit Effektoren der *d*-Aminosäure-oxydase wurden noch auf andere Substanzen ausgedehnt. Dabei zeigte sich, dass Natriumcarbonat und Natriumhydrogencarbonat sowie Natriumfluorid und Natriumacetat den Abbau von *d*-Alanin steigern können. Andererseits wirken Malonsäure und arsenige Säure als Hemmkörper des *d*-Alanin-Abbaues. Weiterhin hat sich gezeigt, dass Leicht- und Schwermetallionen in den üblichen Konzentrationen keinen Einfluss auf das Reinenzym ausüben.

#### Besprechung der Ergebnisse.

In der 6. Mitteilung haben wir aus der Tatsache der Aktivierbarkeit des Abbaues der *d*-Aminosäure-oxydase durch die verschiedenartigsten Proteine und Aminosäuren die Vorstellung der komplexen Natur der *d*-Aminosäure-oxydase entwickelt. Aus den vorliegenden Untersuchungen geht nun hervor, dass auch die Blausäure, also eine körperfremde Substanz, ganz analog auf die *d*-Aminosäure-oxydase einwirken kann. Andererseits ist bekannt, dass die Blausäure als Komplexbildner in sehr variabler Weise mit Enzymen in Beziehung treten kann. Es scheint uns deshalb die Annahme berechtigt, dass das System Reinenzym-Blausäure ein Modell der komplexen *d*-Aminosäure-oxydase darstellt.

Im weiteren erwies sich das Pyrophosphat als kräftiger Aktivator der *d*-Aminosäure-oxydase. Es scheint nicht ausgeschlossen, dass durch das Zusammenwirken des Pyrophosphats mit der *d*-Aminosäure-oxydase ein auch im Leben wirksamer Komplex auftreten kann. Dass dem Pyrophosphat grosse biologische Wirksamkeit zukommen kann, ist an zahlreichen Beispielen bekannt geworden. Wir erinnern an die Adenosin-di- u. tri-phosphate, an das Aneurinpyrophosphat usw. Bemerkenswerterweise hat sich gezeigt, dass sich Semicarbazid im Vergleich zu Blausäure vollständig gegensätzlich verhält, indem sich nachweisen liess, dass es als kräftiger Inhibitor der *d*-Aminosäure-oxydase wirken kann. Das gegensätzliche Verhalten dieser beiden Carbonylreagentien weist daraufhin, dass diese Substanzen offenbar auch noch in anderer Weise mit Enzymen in Beziehung treten können als durch Hauptvalenzbildung an eine Carbonylgruppe des Fermentes.

*Krebs* hat als wichtiges Kriterium zur Charakterisierung der *l*-Aminosäure-oxydase neben der Blausäure-Hemmung die hemmende Wirkung des Octylalkohols hervorgehoben. Wir möchten nochmals betonen, dass wir seine Untersuchungen an Ratten-Nierenpräparaten in vollem Umfang bestätigen konnten. Die Tatsachen jedoch, dass unter anderen experimentellen Bedingungen die *d*-Aminosäure-oxydase einerseits durch Octylalkohol kräftig gehemmt und andererseits durch Blausäure aktiviert wird, lassen es fraglich erscheinen, ob solche Kriterien zur Abgrenzung einzelner Enzym-Individuen geeignet sind.

#### Zusammenfassung.

1. Die gereinigte *d*-Aminosäure-oxydase lässt sich durch Blausäure und Pyrophosphat in eminenter Weise aktivieren.
2. Die Aktivierung erfolgt analog der Aktivierung durch Aminosäuren und Proteine.
3. Semicarbazid und Octylalkohol hemmen die gereinigte *d*-Aminosäure-oxydase.

Fräulein *Frieda Nebiker* sei für wertvolle Mithilfe bestens gedankt.

Diese Arbeit wurde dem einen (A. W.) von uns durch ein Stipendium von der *Stiftung für biologisch-medizinische Stipendien der Schweizerischen Akademie der medizinischen Wissenschaften* ermöglicht, für das er auch hier seinen herzlichsten Dank aussprechen möchte.

Basel, im Dezember 1945

Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

#### 23. Die Umsetzung des Caseins mit Formaldehyd.

#### VI. Über die Ursache des Versagens der Methode von *Highberger* und *Retzsch* zur quantitativen Bestimmung des Formaldehyds in gehärteten Caseinen

von Hs. Nitschmann und H. Lauener.

(21. XII. 45.)

Zu Beginn unserer Untersuchungen über die Umsetzung des Caseins mit Formaldehyd bemühten wir uns um die Ausarbeitung einer Methode zur quantitativen Bestimmung des vom Protein gebundenen Formaldehyds<sup>1)</sup>. Für formaldehydgegerbtes Kollagen lag eine sehr gute Analysenvorschrift von *Highberger* und *Retzsch*<sup>2)</sup> vor, von deren Zuverlässigkeit wir uns durch eigene Testversuche über-

<sup>1)</sup> Helv. **24**, 237 (1941) und **26**, 1069 (1943).

<sup>2)</sup> J. Am. Leather Chem. Assoc. **33**, 341 (1938).