

112. Über die enzymatische Decarboxylierung von β -Keto-carbonsäurenvon **P. Karrer** und **F. Haab**.

(16. III. 48.)

Nach Untersuchungen von *M. Stärkle*¹⁾ und *O. Acklin*²⁾ werden mittlere Fettsäuren durch Schimmelpilze nach dem Prinzip der β -Oxydation zu Methyl-alkylketonen abgebaut. Die Reaktion spielt sich beim Ranzigwerden der Fette ab; in der letzten Stufe ist sie eine Decarboxylierung.



Im Zusammenhang mit Arbeiten über andere Decarboxylierungsvorgänge³⁾ haben wir versucht, über diese β -Ketocarbonsäure-decarboxylase etwas mehr zu erfahren. Alle in der Literatur beschriebenen Abbauversuche von Fettsäuren durch Schimmelpilze sind mit lebenden Pilzen ausgeführt worden, sodass über die Natur der daran beteiligten Fermente nichts Näheres bekannt ist.

Wir haben mit einer grosseren Anzahl verschiedener Schimmelpilze gearbeitet, nämlich mit *Penicillium notatum* Westl., *P. citrinum* Thom., *P. glabrum* (Wehmer) Westl., *P. luteum* Zukal, *P. chrysogenum* Thom., *P. cyclopium* Westl. und *Penicillium glaucum*.

Von diesen wurden Trockenpulver bereitet und letztere auf verschiedene β -Ketocarbonsäuren, n-Butyrylessigsäure, Capronylessigsäure und Oenantylessigsäure zur Einwirkung gebracht. Wie die Versuchsprotokolle zeigen, war in allen diesen Trockenpulvern ein Ferment vorhanden, welches die Decarboxylierung der β -Ketocarbonsäure beschleunigte. Hatte man die Pilzkultur vor ihrer Verwendung als Enzympräparat eine Minute auf 100° erhitzt, so war das Präparat wirkungslos; dadurch wird die enzymatische Natur des Aktivators der Decarboxylierung der β -Ketosäuren bestätigt.

Diese Decarboxylase ist aber ein sehr unbeständiges Enzym. Schon eine Acetonbehandlung des Schimmelpilzes bei 0° zerstört das Ferment; es ist bisher auch nicht gelungen, dieses durch Autolyse der Schimmelpilze freizusetzen oder wirksame Extrakte aus den Schimmelpilzen zu gewinnen. Vorläufig besteht daher der Eindruck, dass es sich um ein an die Zellen gebundenes, endogenes Ferment handelt.

Keines der bekannten, wasserlöslichen Vitamine beeinflusst seine Wirksamkeit; ebenso unwirksam sind die Cocarboxylase und Pyrid-

1) Bioch. Z. **151**, 371 (1924).

2) Bioch. Z. **204**, 253 (1929).

3) Helv. **29**, 711, 1981 (1946); **30**, 54, 268, 524, 528 (1947)

oxalacetalphosphat. Auch ein Zusatz von Fe^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} , Fe^{+++} oder Mg^{++} hatte auf den Decarboxylierungsvorgang keinen Einfluss.

Die Decarboxylase der β -Ketocarbonsäuren ist also von denjenigen Fermenten, die Brenztraubensäure und denjenigen, die α -Aminocarbonsäuren decarboxylieren, völlig verschieden. Ihre nähere Untersuchung wird durch die Unbeständigkeit dieses Enzyms erschwert.

Experimenteller Teil.

Die zu den Versuchen benutzten β -Ketocarbonsäuren haben wir nach bekannten Verfahren hergestellt: *n*-Butyrylessigsäure nach *H. Hunsdiecker*¹⁾; *n*-Capronylessigesteig nach *L. Bouveault* und *A. Bongert*²⁾, *E. Späth* und *J. Pikel*³⁾, sowie *C. Schöpf* und *G. Lehmann*⁴⁾. Oenanthylessigsäure nach *L. Bouveault* und *A. Bongert*²⁾, sowie *E. Späth* und *J. Pikel*³⁾.

Die Schimmelpilze, die als Fermentquelle dienten, wurden auf einer *Czapek-Dox* Nährlosung gezüchtet, deren Zusammensetzung folgende war:

Saccharose 30 g, NaNO_3 3 g, KCl 1 g, MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, KH_2PO_4 0,5 g, FeSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, aqua dest. ad 1 Liter.

Nach ca. 9tägigem Wachstum bei Zimmertemperatur wurden die Schimmelpilze abgenutscht, mit destilliertem Wasser wiederholt gewaschen und mit dem Wiegemesser so fein als möglich zerschnitten. Nach 2tägigem Aufbewahren im Vakuumexsikkator neben Calciumchlorid war die Substanz trocken. Das so gewonnene Trockenpulver wurde für die Decarboxylierungsversuche direkt verwendet.

Die Decarboxylierungen nahmen wir in der *Warburg*-Apparatur bei einer 20°C nur wenig überschreitenden Temperatur vor. Da die β -Ketosäuren bei diesen Temperaturen spontan etwas CO_2 abgeben, muss diese Selbstzersetzung in einem Blindversuch bestimmt und die betreffende Gasmenge von der beim Fermentierungsversuch erhaltenen in Abzug gebracht werden. Andererseits absorbiert das Pilzpräparat etwas Sauerstoff, sodass auch hierfür eine Korrektur notwendig ist.

Decarboxylierungen von Oenanthylessigsäure durch Trockenpulver verschiedener *Penicillium*arten.

1. Ferment (F): 0,5 g Pilztrockenpulver von *P. notatum* Westl.
in 5 cm^3 Phosphatpuffer ($\text{pH} = 5,6$)

Ketosäure (K): 0,15 Mol/Liter Oenanthylessigsäure

Pufferlösung (Pl): 0,067-n. Phosphatpuffer $\text{pH} = 5,6$

Temperatur: $22,1^\circ\text{C}$.

Zeit (in Minuten)	$\text{mm}^3 \text{CO}_2$ 1 $\text{cm}^3 \text{F}$; 0,7 $\text{cm}^3 \text{H}_2\text{O}$ 1 $\text{cm}^3 \text{Pl}$		$\text{mm}^3 \text{CO}_2$ 1 $\text{cm}^3 \text{F}$; 0,7 $\text{cm}^3 \text{K}$ 1 $\text{cm}^3 \text{Pl}$		$\text{mm}^3 \text{CO}_2$ 2 $\text{cm}^3 \text{Pl}$; 0,7 $\text{cm}^3 \text{K}$	
0	0	0	0	0	0	0
27	+2	+2	+14	+12	+8	+8
71	-2	-4	+32	+39	+19	+21

¹⁾ B. 75, 454 (1942).

²⁾ Bl. [3] 27, 1038 (1902).

³⁾ B. 62, 2250 (1929).

⁴⁾ A. 497, 17 (1932).

2. Ferment (F) 0,5 g Pilztrockenpulver von *P. citrinum* Thom
 Ketosäure (K)
 Pufferlösung (Pl) } wie bei Versuch 1
 Temperatur

Zeit (in Minuten)	mm ³ CO ₂ 1 cm ³ F; 0,7 cm ³ H ₂ O 1 cm ³ Pl		mm ³ CO ₂ 1 cm ³ F; 0,7 cm ³ K 1 cm ³ Pl		mm ³ CO ₂ 2 cm ³ Pl; 0,7 cm ³ K	
0	0	0	0	0	0	0
27	+5	+2	+21	+24	+8	+8
71	+8	+1	+54	+63	+19	+21

3. Ferment (F) 0,5 g Pilzpulver von *P. glabrum* (Wehmer) Westl.
 Ketosäure (K)
 Pufferlösung (Pl) } wie bei Versuch 1
 Temperatur

Zeit (in Minuten)	mm ³ CO ₂ 1 cm ³ F; 0,7 cm ³ H ₂ O 1 cm ³ Pl		mm ³ CO ₂ 1 cm ³ F; 0,7 cm ³ K 1 cm ³ Pl		mm ³ CO ₂ 2 cm ³ Pl; 0,7 cm ³ K	
0	0	0	0	0	0	0
35	+5	0	+14	+7	+10	+10
71	+2	-2	+27	+30	+19	+21

4. Ferment (F) 0,5 g Pilzpulver von *P. luteum* Zukal
 Ketosäure (K)
 Pufferlösung (Pl) } wie bei Versuch 1
 Temperatur

Zeit (in Minuten)	mm ³ CO ₂ 1 cm ³ F; 0,7 cm ³ H ₂ O 1 cm ³ Pl		mm ³ CO ₂ 1 cm ³ F; 0,7 cm ³ K 1 cm ³ Pl		mm ³ CO ₂ 2 cm ³ Pl; 0,7 cm ³ K	
0	0	0	0	0	0	0
35	+6	0	+20	+19	+10	+10
71	+6	+2	+37	+40	+19	+21

5. Ferment (F) 0,5 g Pilzpulver von *P. chrysogenum* Thom
 Ketosäure (K)
 Pufferlösung (Pl) } wie bei Versuch 1
 Temperatur

Zeit (in Minuten)	mm ³ CO ₂ 1 cm ³ F; 0,7 cm ³ H ₂ O 1 cm ³ Pl		mm ³ CO ₂ 1 cm ³ F; 0,7 cm ³ K 1 cm ³ Pl		mm ³ CO ₂ 2 cm ³ Pl; 0,7 cm ³ K	
0	0	0	0	0	0	0
33	+4	+1	+20	+20	+9	+9
71	+4	-2	+45	+44	+19	+21

6. Ferment (F) 0,5 g Pilzpulver von *P. cyclopium* Westl.
 Ketosäure (K) }
 Pufferlösung (Pl) } wie bei Versuch 1
 Temperatur }

Zeit (in Minuten)	mm ³ CO ₂ 1 cm ³ F; 0,7 cm ³ H ₂ O 1 cm ³ Pl		mm ³ CO ₂ 1 cm ³ F; 0,7 cm ³ K 1 cm ³ Pl		mm ³ CO ₂ 2 cm ³ Pl; 0,7 cm ³ K	
0	0	0	0	0	0	0
33	- 5	- 8	+ 20	+ 18	+ 9	+ 9
71	- 14	- 16	+ 42	+ 35	+ 19	+ 21

Decarboxylierung von Butyrylessigsäure durch Trockenpulver von *P. glaucum*.

7. Ferment (F) 0,5 g Pilztrockenpulver von *P. glaucum*
 Ketosäure (K) Butyrylessigsäure 0,15 Mol/Liter
 Pufferlösung (Pl) 0,067-n. Phosphatpuffer p_H = 5,6
 Temperatur 22,0° C.

Zeit (in Minuten)	mm ³ CO ₂ 1 cm ³ F; 0,7 cm ³ H ₂ O 1 cm ³ Pl		mm ³ CO ₂ 1 cm ³ F; 0,7 cm ³ K 1 cm ³ Pl		mm ³ CO ₂ 2 cm ³ Pl; 0,7 cm ³ K	
0	0	0	0	0	0	0
25	- 4	- 9	+ 52	+ 53	+ 21	+ 17
60	- 13	- 26	+ 87	+ 95	+ 41	+ 39

Decarboxylierung von n-Capronylessigsäure durch Trockenpulver von *P. glaucum*.

8. Ferment (F) 0,5 g Pilztrockenpulver von *P. glaucum*
 Ketosäure (K) 94 mg n. Capronylessigsäure in 4 cm³ H₂O
 Pufferlösung (Pl) 0,067-n. Phosphatpuffer p_H = 5,6
 Temperatur 28,0°

Zeit (in Minuten)	mm ³ CO ₂ 1 cm ³ F; 0,7 cm ³ H ₂ O 1 cm ³ Pl		mm ³ CO ₂ 1 cm ³ F; 0,7 cm ³ K 1 cm ³ Pl		mm ³ CO ₂ 2 cm ³ Pl; 0,7 cm ³ K	
0	0	0	0	0	0	0
30	- 17	- 18	+ 83	+ 72	+ 28	+ 25
50	- 22	- 26	+ 126	+ 110	+ 45	+ 44

Zusammenfassung.

Es wurde gezeigt, dass in verschiedenen Arten von Schimmelpilzen ein Ferment vorkommt, welches die Fähigkeit besitzt, mittlere β -Ketocarbonsäuren zu decarboxylieren und in Ketone überzuführen. Dieses Ferment ist verschieden von der Carboxylase und den α -Aminosäurendecarboxylasen.

Zurich, Chemisches Institut der Universität.