

Nichtenzymatische Reaktionen zwischen α -Amino- und α -Ketosäuren, II¹

Durch Kupfer(II)-Ionen und Pyridin katalysierte Umsetzungen
zwischen α -Aminosäuren und Pyruvat

Von

Hermann Mix und Friedrich Wilhelm Wileke

Aus dem Institut für Organische Katalyseforschung Rostock
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin
Direktor: Prof. Dr. W. Langenbeck

(Der Schriftleitung zugegangen am 30. Oktober 1959)

Unter den zahlreichen und mannigfaltigen biochemischen Reaktionen haben besonders diejenigen immer wieder großes Interesse gefunden, bei denen C—C- bzw. C—N-Bindungen geknüpft oder gelöst werden. Zu diesen gehören u. a. die oxydative und nichtoxydative Decarboxylierung von α -Amino- und α -Ketosäuren, die Transaminierung zwischen beiden sowie die oxydative Desaminierung von α -Aminosäuren.

Am Beispiel der Pyridoxalkatalysen ist hinreichend bewiesen worden², daß es notwendig sein kann, für verschiedenartige Umsetzungen beim Reaktionsstart gemeinsame oder ähnliche Reaktionsmechanismen anzunehmen. Als kürzlich gezeigt werden konnte¹, daß es der Mitwirkung von Pyridoxal nicht bedarf, um Aminogruppen zu transferieren, bestand zugleich die Aussicht, die metallionenkatalysierte Transaminierung durch Komplexbildung zu verstärken und weitere Sekundärreaktionen auszulösen. Das hat sich in mehrfacher Hinsicht bestätigt.

A. Transaminierung

Wie Versuche zeigten, sind eine Reihe tert. Basen in der Lage, durch Komplexbildung die transaminierende Wirkung des Kupferions zu steigern. Einstweilen wurden sämtliche Messungen mit Pyridin ausgeführt. In Tab. 1 sind an einigen Beispielen die Umsätze angegeben, wie sie unter den schon früher angewandten Versuchsbedingungen, jetzt aber auch in Gegenwart von 10% Pyridin in neutraler Lösung erzielt wurden. Ihr ist zu entnehmen, daß zum Teil beträchtliche Aktivitätssteigerungen erfolgt sind.

Dabei ist die relative Zunahme bei den ohnehin leicht transaminierenden basischen Aminosäuren naturgemäß am geringsten. Wie groß sie dennoch auch bei diesen sein kann, beweisen die Umsätze

¹ I. Mittel.: H. Mix, diese Z. 315, 1 [1959]; in Abb. 3c der I. Mittel. (S. 8) sind die Abszissenwerte 1,0 bis 4,0 zu ändern in: 0,25, 0,5, 0,75 und 1,0.

² J. B. Longenecker u. E. E. Snell, J. Amer. chem. Soc. 79, 142 [1957].

bei 37°, wo die 24-Stdn.-Werte nicht nur bei den neutralen und sauren, sondern auch bei den basischen Aminosäuren bereits nach 2 Stdn. z. T. erheblich übertroffen sind. Interessant ist ferner, daß, sobald Pyridin mitwirkt, sich die relativen Geschwindigkeiten zwischen Arginin und Lysin umkehren. Hiermit im Zusammenhang dürfte die Beobachtung stehen, daß eine Umkehrung zwischen beiden auch dann eintritt, wenn der Übergang vom sauren ins basische Milieu erfolgt¹.

Tab. 1. % gebildetes Alanin bei der Transaminierung von 2 mMol Brenztraubensäure mit je 1 mMol der angegebenen Aminosäure und 0,5 mMol CuSO₄ in einem Gemisch von 90 cm³ Britton-Robinson-Puffer und 10 cm³ Pyridin bei pH 7.

	Temp. 70°			Temp. 37°			
	ohne Pyrid.	mit Pyrid.	Zunahme um das x-fache	ohne Pyrid.	mit Pyridin		
	2 Stdn.	2 Stdn.		24 Stdn.	2 Stdn.	4 Stdn.	6 Stdn.
Ornithin	65,2	67,4	1,03	35,7	48,0	63,0	71,5
Arginin	27,4	41,6	1,52	17,3	18,2	30,5	37,6
Lysin	26,1	44,4	1,70	15,7	27,9	37,3	47,6
α -Aminobuttersäure	6,8	36,0	5,30	4,3	7,7	14,8	19,1
Methionin	5,4	33,7	6,24	2,6	12,6	19,7	23,8
Asparagin	7,8	21,4	2,74	5,4	4,5	6,8	8,1
Asparaginsäure . .	4,6	32,6	7,10	3,9	4,5	9,7	13,3
Glutaminsäure . .	5,4	27,5	5,30	3,7	6,9	12,7	16,8

B. Transaminierung und oxydative Desaminierung

Die gleichzeitige Freisetzung von Ammoniak und Kohlendioxyd aus Aminosäuren ist ein seit langem bekannter Vorgang, der schon von Strecker³ mit Hilfe von Alloxan, von Ruhemann⁴ mit Ninhydrin und von Traube⁵ durch Isatin ausgelöst wurde. Später kamen entsprechende Umsetzungen mit Methylglyoxal, Glucose und Ketosäuren hinzu⁶. Darüber hinaus wandelte Langenbeck⁷ durch Einschalten von Wasserstoffacceptoren und unter Anwendung des Prinzips der „systematischen Aktivierung“⁸ die Isatinreaktion in einen katalytischen Vorgang um. In neueren Versuchen gelang es, die oxydative Desaminierung von Aminosäuren bzw. von einigen ihrer Ester zu katalysieren, und zwar durch *o*-Chinone

³ A. Strecker, Liebigs Ann. Chem. **123**, 363 [1862].

⁴ S. Ruhemann, J. chem. Soc. [London] **97**, 2025 [1910]; **99**, 792, 1486 [1911].

⁵ W. Traube, Ber. dtsh. chem. Ges. **44**, 3145 [1911].

⁶ C. Neuberg u. M. Kobel, Biochem. Z. **185**, 477 [1927]; **188**, 197 [1927]; Sh. Akabori, Ber. dtsh. chem. Ges. **66**, 143 [1933]; W. Langenbeck u. R. Hutschenreuter, Z. anorg. allg. Chem. **188**, 1 [1930]; R. M. Herbst u. L. L. Engel, J. bid. Chemistry **107**, 505 [1934]; R. M. Herbst, J. Amer. chem. Soc. **58**, 2239 [1936]; Advances in Enzymol. **4**, 73 [1944].

⁷ W. Langenbeck, Ber. dtsh. chem. Ges. **60**, 930 [1927]. Zusammenfassungen: W. Langenbeck, Die organischen Katalysatoren und ihre Beziehungen zu den Fermenten, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin 1949, S. 29; H. Mix u. W. Langenbeck, Ergebn. Enzymforsch. **13**, 250 [1954].

⁸ W. Langenbeck, R. Hutschenreuter u. R. Jüttemann, Liebigs Ann. Chem. **485**, 53 [1931].

allein oder zusammen mit Metallsalzen⁹, durch Komplexbildung mit Salicylaldehyd und Nickel oder Kupfer¹⁰ und schließlich durch Pyridoxal¹¹ bzw. Benzolhomologe des Pyridoxals¹². Neuerdings lieferten auch Nyilasi¹³ und Krause¹⁴ Beiträge zu diesem Problem.

Während die Reaktionslösungen bisher sorgfältig von Sauerstoff freigehalten wurden, um störende Nebenreaktionen zu vermeiden, sollte nunmehr festgestellt werden, ob in Gegenwart von Luft neben der Transaminierung auch eine oxydative Desaminierung stattfindet. Die ersten beiden Spalten der Tab. 2 zeigen, daß dabei erhebliche Änderungen im Reaktionsverhalten eintreten können. Diese Messungen dienten dem Zweck, einen Einblick in die Stickstoffbilanz und in eventuelle Zusammenhänge zwischen Aminbeweglichkeit und Oxydationsverhalten zu bekommen. Da die oxydative Desaminierung unter denselben Bedingungen ablaufen sollte wie die später zu besprechende Decarboxylierungsreaktion, letztere jedoch ihr Wirkungsoptimum bei einer anderen Substratzusammensetzung hatte, wurden die Konzentrationen gegen früher etwas verändert.

Tab. 2. a) % gebildetes Alanin bei der Transaminierung von 0,2 mMol Natrium-pyruvat mit je 0,05 mMol der angegebenen Aminosäuren in Gegenwart von 0,05 mMol CuSO₄ und 3 mMol Pyridin in 3,5 cm³ 0,43*m* Phosphatpuffer bei *p*_H 7, Inkubation 2 Stdn. bei 37° unter Stickstoff; b) Bedingungen wie bei a), jedoch unter Luft; c) % gebildetes Ammoniak bei der oxydativen Desaminierung unter vorstehenden Reaktionsbedingungen.

	a	b	c		a	b	c
<i>α, γ</i> -Diamino-							
buttersäure . . .	4,4	4,3	5,8	Leucin	15,0	4,6	4,2
Ornithin	55,8	54,8	13,3	Norvalin	14,0	5,8	3,6
Lysin	32,6	31,7	15,1	<i>α</i> -Aminobuttersäure	11,2	5,9	3,6
Arginin	21,0	5,0	6,2	Alanin	—	—	3,2
Glutaminsäure . . .	11,6	4,8	6,4	Glycin	4,6	<1	24,0
Asparaginsäure . . .	9,6	<1	5,1	Serin	3,5	2,1	10,0
Asparagin	6,7	<1	9,3	Isoleucin	3,0	2,8	1,5
Methionin	13,0	2,3	5,3	Valin	<1	<1,0	≤1
Phenylalanin	12,0	2,0	9,7	Histidin	≤1	≤1,0	<1

Wie ersichtlich, ist die Transaminierung unter dem Einfluß von Sauerstoff teilweise sehr stark vermindert. Es lag nahe, die Differenz oder einen Teil derselben in freigesetztem Ammoniak zu suchen. Diese Annahme hat sich grundsätzlich bestätigt, wenn auch, wie zu erwarten war, mit Einschränkungen und Besonderheiten. Wie aus Spalte c der Tab. 2 hervorgeht, geben sämtliche untersuchten Aminosäuren Ammo-

⁹ B. Kisch, *Biochem. Z.* **263**, 98 [1933]; B. Kisch u. K. Schuwirth, ebenda **263**, 195 [1933]; **268**, 158 [1934]; B. Kisch u. U. Hecht, ebenda **271**, 424 [1934]; K. Schuwirth, ebenda **271**, 427 [1934] u. früher.

¹⁰ P. Pfeiffer, W. Offermann u. H. Werner, *J. prakt. Chem.* **159**, 313 [1941].

¹¹ D. E. Metzler u. E. E. Snell, *J. biol. Chemistry* **198**, 353 [1952].

¹² M. Ikawa u. E. E. Snell, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 653, 4900 [1954].

¹³ J. Nyilasi, *Acta chim. Acad. Sci. hung.* **15**, 51 [1958]; **17**, 265 [1958]; **21**, 235 [1959].

¹⁴ H. W. Krause, *Chem. Ber.* **92**, 1914 [1959].

niak ab. Entsprechend den Unterschieden bei der Transaminierung sind auch die abgespaltenen Ammoniakmengen weit abgestuft, wobei eine gewisse Parallelität zwischen beiden Vorgängen vorhanden ist. Andererseits ergeben sich aber eine Reihe von unerwarteten Befunden. So spalten Ornithin und Lysin, die unter Luft und Stickstoff etwa gleich gut transaminieren, erhebliche Mengen von Ammoniak ab, dagegen bleibt die erwartete starke Ammoniakentwicklung beim Arginin aus. Weiterhin erscheint Glycin als Ausnahme, da es zwar nur mäßig transaminiert, aber Ammoniak kräftig entwickelt, was übrigens einer bereits von Kisch¹⁵ gemachten Beobachtung völlig entspricht. Aber auch Serin ist beim Desaminieren etwa dreimal so aktiv wie beim Transaminieren, so daß man es beim Glycin und Serin wohl mit einem tiefergreifenden Abbau während der chelatkatalysierten Oxydation zu tun hat; auf diese Möglichkeit deuten die nachfolgenden Carboxylasemessungen ebenfalls hin. Die lebhaftere Ammoniakentbindung im Falle des Asparagins ist auf die teilweise Hydrolyse des Amids zurückzuführen, da auch unter Stickstoff zur selben Zeit etwa 6–8% freies Ammoniak gemessen wird.

C. Oxydative und nichtoxydative Decarboxylierung

Mit der eben behandelten Transaminierung und der oxydativen Desaminierung ist die Decarboxylierungsreaktion eng verknüpft. Das ist nicht überraschend, denn viele der einleitend aufgeführten Modellreaktionen verhalten sich ähnlich. So wird während der oxydativen Desaminierung zumeist auch Kohlendioxyd abgegeben.

Da nun die bisherigen synthetischen Katalysatoren für den Aminosäureabbau, wie Diketone, Aldehyde, Metallchelate u. a., durch den Gesamtkomplex α -Ketosäure-Kupfersulfat-Pyridin ersetzbar waren, bei Fortlassung einer dieser Komponenten die α -Aminosäuren jedoch oxydativ nicht verändert wurden, war auch mit einer teilweise irreversiblen Umsetzung der α -Ketosäuren zu rechnen. Zu dieser Annahme berechtigte insbesondere der starke Sauerstoffverbrauch und eine beträchtliche Kohlendioxydentwicklung. Darüber hinaus bewies die in der Reaktionslösung überwiegend unversehrt gebliebene Aminosäure, daß sie offenbar als Katalysator bei der oxydativen Decarboxylierung von α -Ketosäuren mitwirkt. Natürlich gibt auch die während der Katalyse nebenher desaminierte Aminosäure unter Aufnahme entsprechender Sauerstoffmengen Kohlendioxyd ab, und u. U. kann die aus der Transaminierung hervorgegangene α -Ketosäure leichter zerfallen als die ursprüngliche α -Ketosäure (z. B. Brenztraubensäure); doch die hierdurch bedingten Gasumsätze bleiben weit hinter denen der Ketosäureoxydation zurück.

Im Zusammenspiel mit Metallionen und Basen laufen somit zwischen α -Amino- und α -Ketosäuren Reaktionen ab, die in der Natur durch zwei verschiedene Enzymsystem, in vitro jedoch von den betreffenden Coenzymen auch allein mehr

¹⁵ B. Kisch, *Biochem. Z.* **236**, 380 [1931]; ebenda **242**, 1 [1931].

oder weniger gut katalysiert werden. Wie das Coenzym Pyridoxalphosphat vielfältige spezifische Umsetzungen an α -Aminosäuren veranlaßt, sobald es an verschiedene Apoenzyme gebunden ist^{16,17}, löst das Thiaminpyrophosphat gleichermaßen mehrere Reaktionen an α -Ketosauren aus¹⁸. Nichtenzymatische Umsetzungen mit Hilfe des jeweiligen Coenzym sind kürzlich von Westheimer¹⁹ zusammenfassend beschrieben worden. Neuere Ergebnisse von entsprechenden Modellversuchen finden sich i. c.^{17,18}. Im gleichen Zusammenhang befaßte sich Westheimer auch mit dem Einfluß von Metallionen auf die Decarboxylierung von β -Ketosauren¹⁹. Zu diesem Problem gibt es ebenfalls weitere Übersichtsberichte²⁰. Ganz allgemein ist festzustellen, daß die Modelluntersuchungen zur metallionenkatalysierten Decarboxylierung bislang vorwiegend auf die ohnehin leichter zersetzbaren β -Ketosauren beschränkt blieben. Erst in jüngerer Zeit berichteten Kalnitsky und Mitarbeiter²¹ über die nichtenzymatische, durch Mangan(II)- und Kobalt(III)-Ionen ausgelöste Oxydation von α -Ketoglutaräure, wobei die Manganionen-Katalyse durch einige Aminosäuren zusätzlich beschleunigt wurde. Neuerdings untersuchte Schellenberger²² in mehreren Arbeiten die Decarboxylierung von Brenztraubensäure durch Aluminiumionen bzw. Basen und Aluminiumsalze sowie ganz allgemein den oxydativen und nichtoxydativen Abbau von α -Ketosauren durch Metallsalze.

Nachdem feststand, daß Pyridin die metallionenkatalysierte oxydative Decarboxylierung zwischen α -Amino- und α -Ketosauren beschleunigt, wurde diese Reaktion zunächst bei veränderten Pyridinkonzentrationen studiert. In Abb. 1 ist die Sauerstoffmenge angegeben, die von dem System Aminosäure-Ketosäure-Kupfersulfat-Pyridin innerhalb von 2 Stdn. aufgenommen wurde. Bei gleichbleibender Konzentration an Kupfersulfat, Aminosäure und Ketosäure (Molverhältnis 1:1:4) wurde Pyridin, bezogen auf Kupfersulfat, im 10-, 20-, 40-, 60- und 80-fachen Überschuß verwandt.

¹⁶ E. E. Snell, *Physiol. Rev.* **33**, 509 [1953]; E. Werle, *Angew. Chem.* **63**, 550 [1951]; **64**, 311 [1952].

¹⁷ E. Knox u. E. J. Behrmann, *Annu. Rev. Biochem.* **28**, 229 [1959]; M. E. Coates u. J. W. G. Porter, ebenda **28**, 455 [1959]; M. J. Coon u. W. G. Robinson, ebenda **27**, 591 [1958]; C. H. Lushbough u. B. S. Schweigert, ebenda **27**, 326 [1958]; L. D. Greenberg, ebenda **26**, 217 [1957]; H. Kamin u. P. Handler, ebenda **26**, 432, 446 [1957].

¹⁸ Literatur u. a. bei F. H. Westheimer in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck, *The Enzymes*, 2. Aufl., Acad. Press, New York 1959, Bd. 1, S. 287; I. C. Gunsalus in *The Mechanism of Enzyme Action*, Johns Hopkins Press, Baltimore 1954, S. 552; L. J. Reed, *Advances in Enzymol.* **18**, 333 [1957]; S. Ochoa, ebenda **15**, 183 [1954]; M. K. Horwitt, *Annu. Rev. Biochem.* **28**, 411 [1959]; H. P. Sarrett u. A. B. Morrison, ebenda **27**, 339 [1958]; G. D. Novelli, ebenda **26**, 250 [1957].

¹⁹ F. W. Westheimer in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck, *The Enzymes*, Bd. 1, S. 262, 270, 288 [1959].

²⁰ R. J. P. Williams in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck, *The Enzymes*, Bd. 1, S. 409 [1959]; G. L. Eichhorn in *The Chemistry of the Coordination Compounds*, Reinhold Publishing Corporation, New York 1956, S. 706; A. E. Martell u. M. Calvin in „Die Chemie der Metallchelate-Verbindungen“, Verlag Chemie, Weinheim 1958, S. 373.

²¹ J. J. Rackis u. G. Kalnitsky, *J. biol. Chemistry* **225**, 751 [1957]; G. Kalnitsky, ebenda **201**, 817 [1953].

²² A. Schellenberger u. R. Selke, *J. prakt. Chem.* [4] **8**, 379 [1959]; A. Schellenberger u. E. Podany, *Chem. Ber.* **91**, 1781 [1958]; A. Schellenberger, diese Z. **309**, 16 [1957]; W. Langenbeck u. A. Schellenberger, *Arch. Biochem. Biophysics* **69**, 22 [1957].

Es zeigte sich, daß zur optimalen Wirkung verhältnismäßig viel Pyridin erforderlich ist, und daß die einzelnen Aminosäuren trotz stark unterschiedener Aktivitäten anfangs eine nahezu gleichförmige Wirkungssteigerung erfahren. Obgleich auch mit 4 mMol Pyridin auf 0,05 mMol Kupfersulfat das Aktivitätsmaximum noch nicht ganz erreicht ist, eine entscheidende Verlangsamung jedoch schon bedeutend

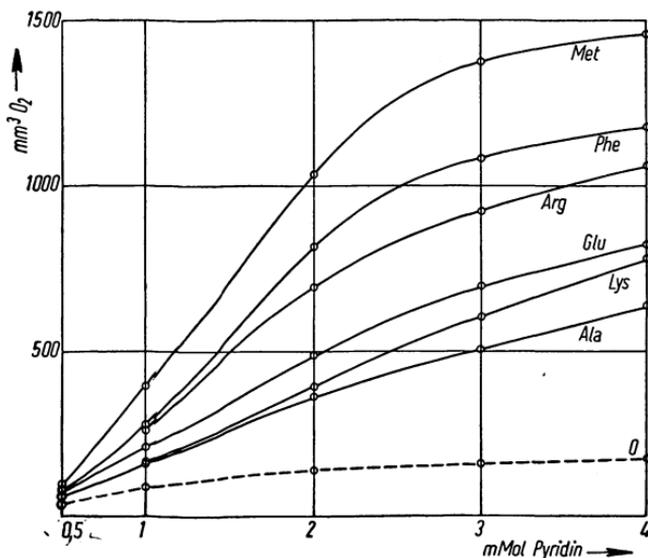


Abb. 1. Sauerstoffverbrauch von 0,2 mMol Brenztraubensäure und 0,05 mMol der jeweils angegebenen Aminosäure in Gegenwart von 0,05 mMol Kupfersulfat und verschiedenen Pyridinmengen in 3,5 cm³ 0,43m Phosphatpuffer bei pH 7; Inkubation 2 Std. bei 37° unter Luft. (0 = Blindversuch ohne Aminosäure.)

früher eintritt, wurden alle künftigen Messungen in Gegenwart von 3 mMol Pyridin durchgeführt.

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen nun den Verlauf der oxydativen Decarboxylierung von Brenztraubensäure in Anwesenheit von Kupfersulfat, Pyridin und jeweils einer der insgesamt 18 Aminosäuren. Während in Abb. 2 der zu verschiedenen Zeiten verbrauchte Sauerstoff aufgetragen ist, gibt Abb. 3 das Ausmaß des dabei entwickelten Kohlendioxids wieder.

Man sieht, daß sich die Aminosäuren fast gleichmäßig auf den gesamten Bereich zwischen Hemmung und starker Aktivierung verteilen. Dabei ist bemerkenswert, daß im Gegensatz zur Transaminierung jetzt einige neutrale Aminosäuren, und zwar Methionin, Glycin, Phenylalanin und Leucin mit sechs- bis neunfachen Beschleunigungen an der Spitze stehen. Andererseits bestätigen Valin und Histidin durch permanente Hemmung auch bei dieser Katalyse ihre Ausnahmestellung¹.

Interessant ist ferner die Reihe der basischen Aminosäuren, in der α,γ -Diamino-buttersäure als starker Komplexbildner hemmt, Ornithin dagegen drei-, Lysin vier- und Arginin sechsfach beschleunigen. Vervollständigt wird das Wirkungsspektrum durch einige neutrale Aminosäuren und durch Asparagin- und Glutaminsäure, die in der Mitte liegen, sowie durch Serin und Isoleucin, welche am schwächsten aktivieren.

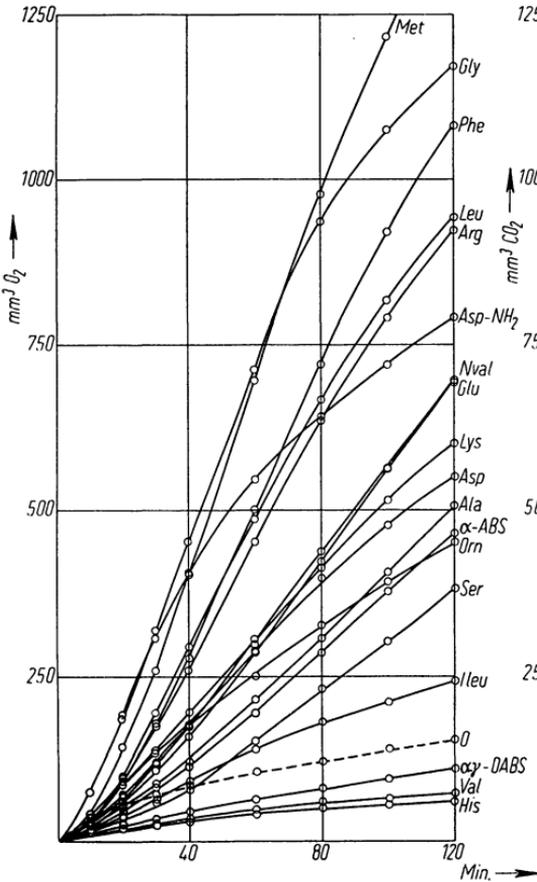


Abb. 2. Sauerstoffaufnahme

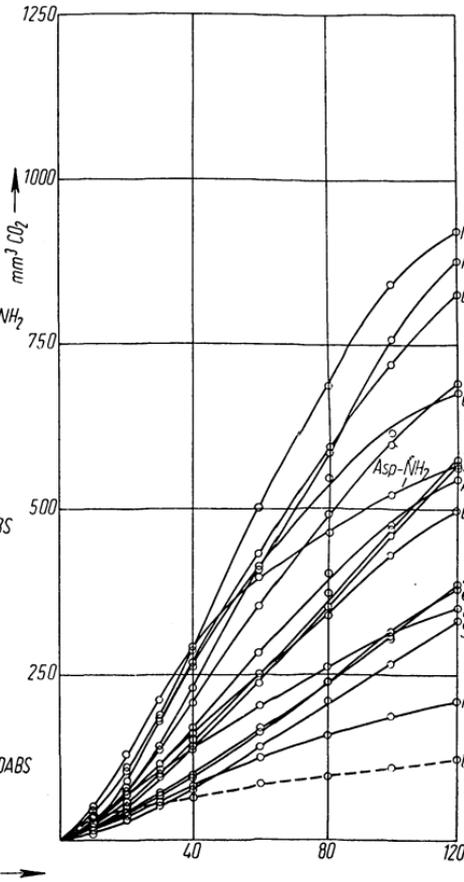


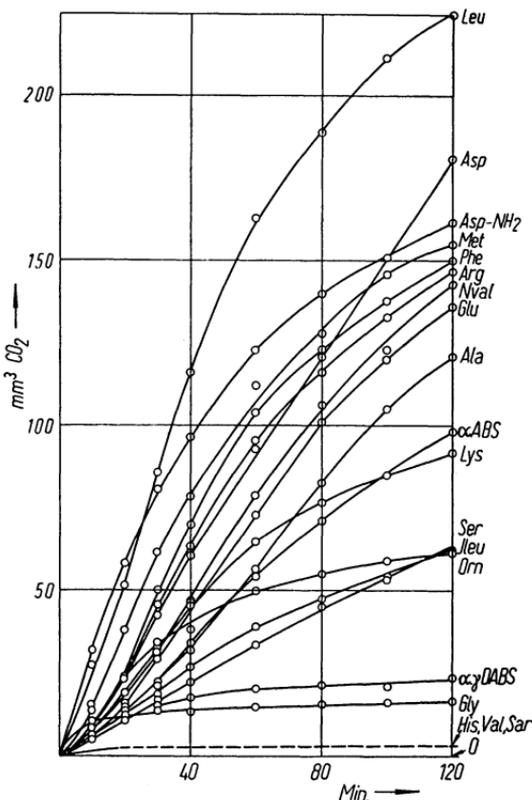
Abb. 3. Kohlendioxydentwicklung

bei der oxydativen Decarboxylierung von 0,2 mMol Brenztraubensäure in Gegenwart von 0,05 mMol der jeweiligen Aminosäure, 0,05 mMol Kupfersulfat und 3,0 mMol Pyridin in 3,5 cm³ 0,43*m* Phosphatpuffer bei pH 7 zu verschiedenen Zeiten bei 37° unter Luft. (α -ABS = α -Amino-buttersäure; α,γ -DABS = α,γ -Diamino-buttersäure; 0 = Blindversuch ohne Aminosäure.)

Sieht man beim Vergleich vom Glycin ab, dann ist die Reihenfolge der Aminosäuren in Abb. 3 mit der in Abb. 2 nahezu identisch. Die Tatsache, daß die Respirationsquotienten bei allen Messungen in engen Grenzen übereinstimmen, mag als Hinweis angesehen werden, daß dem

katalytischen Umsatz stets der gleiche Vorgang zugrunde liegt. Lediglich Glycin scheint dabei selbst stärker abgebaut zu werden, da in diesem Fall nur etwa halb so viel Kohlendioxyd abgegeben, wie Sauerstoff aufgenommen wird. Es zeigt sich demnach auch hier ein Zusammenhang mit den Ergebnissen bei der oxydativen Desaminierung, und es dürfte angebracht sein, das Verhalten des Glycins mit seiner Fähigkeit, als einzige Aminosäure Aldimine zu bilden, in Beziehung zu setzen.

Abb. 4. Kohlendioxydentwicklung bei der nichtoxydativen Decarboxylierung von 0,2 mMol Brenztraubensäure in Gegenwart von 0,05 mMol der jeweiligen Aminosäure, 0,05 mMol Kupfersulfat und 3,0 mMol Pyridin in 3,5 cm³ 0,43*m* Phosphatpuffer bei p_H 7 zu verschiedenen Zeiten bei 37° unter Stickstoff. (α -ABS = α -Amino-buttersäure; α , γ -DABS = α , γ -Diamino-buttersäure; Sar = Sarkosin; 0 = Blindversuch ohne Aminosäure.)



Die nichtenzymatische Decarboxylierung von α -Keto- und α -Aminosäuren braucht nun nicht unbedingt mit einer Oxydation derselben gekoppelt zu sein. Bekanntlich können beide unter bestimmten Bedingungen Kohlendioxyd abspalten und sich in die entsprechenden Aldehyde bzw. Amine umwandeln. Erst kürzlich wurden neue Versuche zur katalytischen Decarboxylierung von α -Aminosäuren mitgeteilt²³. In beiden Arbeiten beruhte sie auf einer erleichterten thermischen Spaltung, und zwar bei Dose durch die Mitwirkung von aromatischen

²³ K. Dose, Nature [London] **179**, 734 [1957]; Chem. Ber. **90**, 1251 [1957]; M. C. Chatelus, C. R. heb. Séances Acad. Sci. **248**, 690 [1959].

Aldehyden, bei Chatelus unter Beteiligung von Ketonen. Die im Verlauf unserer Untersuchungen zutage getretene Katalysewirkung des Kupfer(II)-Pyridin-Komplexes bei Umsetzungen zwischen Carbonyl- und Aminogruppen findet auch an dieser Stelle ihre Fortsetzung. Aus dem üblichen Reaktionsgemisch wird nämlich schon bei 37° unter Stickstoffatmosphäre eine nicht unbedeutende Menge an Kohlendioxyd freigesetzt. Zwar bleibt noch zu beweisen, aus welcher der beiden möglichen Quellen das Kohlendioxyd allein oder überwiegend stammt; fest steht jedoch, daß in Abwesenheit einer der beiden Säuren keine Gasentwicklung eintritt.

Aus Abb. 4 geht nun ein weiteres Mal hervor, wie spezifisch die Aminosäuren bei der Freisetzung von Kohlendioxyd wirken, allerdings entwickelt sich, wie der Vergleich mit Abb. 3 zeigt, in Abwesenheit von Sauerstoff erheblich weniger Kohlendioxyd. Besonders bemerkenswert sind jedoch die Veränderungen, die in der Aufeinanderfolge der Aminosäuren gegenüber der oxydativen Decarboxylierung eingetreten sind. Demnach ist jetzt Leucin mit Abstand am wirksamsten vor Asparagin und Asparaginsäure, welche die bisher so aktiven Aminosäuren Methionin und Phenylalanin ebenfalls noch hinter sich gelassen haben. Die Reihenfolge der basischen Aminosäuren ist unverändert geblieben, dagegen verhält sich bei den neutralen, von den anfangs erwähnten Verschiebungen abgesehen, allein Glycin stark abweichend; es hat nämlich auf die nichtoxydative Decarboxylierung so gut wie gar keinen Einfluß.

Über den Reaktionsmechanismus, insbesondere über die Basenwirkung, sollen künftige Untersuchungen Aufschluß geben. Immerhin besteht Grund zu der Annahme, daß die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Reaktionen einen Zwischenzustand durchlaufen, der eine Schiffsche Base aus α -Amino- und α -Ketosäure einschließt.

Fräulein Ingrid Peckruhn und Fräulein Dorit Scholz sind wir für fleißige und gewissenhafte Mitarbeit sehr zu Dank verpflichtet. Auch Fräulein Hedwig Suhrbier haben wir für wertvolle Unterstützung zu danken.

Methodik

Die Versuche zu den unter Abschnitt A beschriebenen Transaminierungen wurden wie früher beschrieben¹ durchgeführt. Die dortigen Angaben zu den verwendeten Substanzen und Lösungen gelten auch für diese Arbeit. Das neu gebrauchte Pyridin wurde durch Kochen mit Permanganatlösung von Homologen befreit, nach dem Trocknen mehrfach fraktioniert destilliert und über Ätzkali aufbewahrt.

Alle unter B und C beschriebenen Reaktionen wurden in der Warburg-Apparatur ausgeführt. Dabei wurden Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydentwicklung manometrisch verfolgt²⁴, die Transaminierung nach Papierchromatographie wie üblich photometrisch bestimmt und die Desaminierung nach Absorption des Ammoniaks durch Schwefelsäure und Umsatz mit Ninhydrin ebenfalls im Photometer festgestellt.

²⁴ W. W. Umbreit, R. H. Burris u. J. F. Stauffer, *Manometric Techniques*, Burgess Publishing Co., Minneapolis 1957, S. 28.

Die Reaktionsgemische wurden in folgender Weise hergestellt: In die mit zentralen Einsatz und Seitenarm versehenen Atmungströge wurden 0,5 cm³ 0,1*m* Kupfersulfat, 0,5 cm³ einer 0,1*m*-Lösung der jeweiligen Aminosäure, 0,5 cm³ 6*m*, mit Schwefelsäure neutralisiertes, wäbr. Pyridin und schließlich 1 cm³ 1,5*m* Phosphatpuffer nach Sörensen einpipettiert. Ferner wurde in den Seitenarm 1 cm³ 0,2*m* Natriumpyruvat eingegeben und der zylindrische Einsatz mit einem vielfach gefalteten, den Rand um etwa 0,5 cm überragenden, Filterpapier versehen. Das Filter wurde mit 0,2 cm³ 30proz. Kalilauge getränkt, wenn der Sauerstoffverbrauch gemessen werden sollte, dagegen wurde es mit derselben Menge kohlenstoffsaurem Wasser durchfeuchtet, wenn die entwickelte Kohlensäure zu errechnen war. Sollte die Reaktion unter Luft vonstatten gehen, dann wurden jetzt der Seitenarm zugestopft, die Manometer aufgesetzt und die ganze Anordnung 20 Min. im Thermostaten unter Schütteln auf 37° temperiert. Für den Fall, daß Sauerstoff der Reaktionslösung ferngehalten werden sollte, wurde der Seitenarmverschluss durch einen Kapillarstopfen ersetzt; für die Dauer des Temperierens wurde dann über diesen fortwährend ein Strom von hochgereinigtem Stickstoff durch den Atmungstrog hindurchgeleitet, von denen zweckmäßigerweise mehrere hintereinander geschaltet waren. Nach 30 Min. wurde dann die Natriumpyruvatlösung im Seitenarm durch Neigen der Gefäße mit der Hauptlösung vermischt und damit die Reaktion in Gang gesetzt.

Die Menge des während der oxydativen Decarboxylierung entstandenen Kohlendioxyds ergab sich aus der Volumendifferenz, die dadurch entsteht, daß Kohlendioxyd einmal absorbiert und einmal mit Sauerstoff zusammen abgelesen wird. Sämtliche in den Abbildungen wiedergegebenen Werte stellen das Mittel aus mindestens 6 Messungen dar.

Zur Bestimmung der Transaminierung in den Warburg-Gefäßen wurde die Reaktion zur gewünschten Zeit durch Zugabe von 0,5 cm³ einer 0,2*m*-Lösung von Äthylendiamin-tetraessigsäure abgebrochen. Papierchromatographie und Auswertung entsprachen der früheren Vorschrift¹.

Zur quantitativen Bestimmung des Ammoniaks war es notwendig, die Versuchsanordnung und -durchführung aus verschiedenen Vorschriften zu kombinieren und abzuwandeln. Nach systematischen Untersuchungen bewährte sich schließlich folgende Methode: Zunächst erforderte die Ammoniakbestimmung Atmungströge mit 2 Seitengefäßen, von denen das eine jetzt zur Aufnahme der zusätzlich benötigten 0,5 cm³ gesättigten Kaliumboratlösung + 0,25 cm³ 0,4*m* Komplexeonlösung diente²⁵. Zugleich wurde der mittlere Einsatz mit dem schon erwähnten Faltenfilter aus Papier zum Chromatographieren versehen und dieses mit 0,2 cm³ 0,4*m* Schwefelsäure durchfeuchtet²⁶. Sodann läßt man die Oxydationsreaktion in der üblichen Weise in der Warburg-Apparatur ablaufen. Zur vorgesehene Zeit vereinigte man die Komplexeon-Kaliumboratlösung aus dem Seitenarm mit dem Reaktionsgemisch im Hauptgefäß und brach dadurch die Reaktion ab. Da das p_H damit gleichzeitig auf etwa 11 gestiegen war, gelang es, durch weiteres vierstündiges Schütteln das gesamte vorher entbundene Ammoniak auszutreiben und durch das schwefelsaure Filter zu absorbieren. Das Filter wurde anschließend in ein Reagenzglas gebracht und mit 10 cm³ bidestilliertem Wasser durch längeres Stehenlassen bei Zimmertemperatur ausgewaschen. Von dem Eluat wurden sodann aliquote Mengen abgenommen und in kalibrierte Reagenzröhrchen gebracht. Nach Hinzufügen von 1 cm³ 1*m* Citratpuffer von p_H 5, enthaltend 0,07 mMol Kaliumcyanid²⁷ und 1 cm³ einer 1proz. wäbr. Ninhydrinlösung, erhitze man die derart vorbereiteten Lösungen 35 Min. im Wasserbad auf 95°, kühlte anschließend in fließendem Wasser auf Zimmertemperatur ab, füllte mit bidest. Wasser auf

²⁵ G. C. Cotzias u. J. J. Greenough, Arch. Biochem. Biophysics **75**, 15 [1958].

²⁶ B. M. Braganca, J. H. Quastel u. R. Schucher, Arch. Biochem. Biophysics **52**, 18 [1954].

²⁷ F. G. Fischer u. H. Bohn, diese Z. **302**, 278 [1955].

genau 10 cm³ auf und photometrierte bei 574 m μ innerhalb der nächsten Stunde gegen einen Blindversuch. Die mitgeteilten Werte stellen das Mittel aus jeweils mindestens 25 Bestimmungen dar.

Zusammenfassung

Bei der Reaktion zwischen α -Aminosäuren und Brenztraubensäure in neutraler Lösung in Gegenwart von Kupfer(II)-Ionen und Pyridin erfolgte unter Stickstoff in erster Linie Transaminierung, in geringerem Umfang Decarboxylierung; unter Sauerstoff traten unterschiedlich starke Desaminierung und teilweise sehr kräftige oxydative Decarboxylierung ein.

Die Transaminierung einer Reihe von α -Aminosäuren mit Brenztraubensäure wurde bei 37 und 70° über 2, 4 und 6 Stdn. durchgeführt und mit der durch Pyridin nicht katalysierten Reaktion verglichen. Außerdem wurde die innerhalb von 2 Stdn. bei 37° oxydativ freigesetzte Ammoniakmenge an 18 verschiedenen Aminosäuren nach einer modifizierten Vorschrift bestimmt. In weiteren Warburg-Messungen wurden sowohl das Ausmaß der Kohlendioxydentwicklung unter Stickstoff, als auch die Sauerstoffaufnahme und CO₂-Entbindung unter Luft am System Kupfersulfat-Pyridin-Brenztraubensäure und je einer der Aminosäuren ebenfalls bei 37° verfolgt. Dabei zeigte sich, daß der Umsatz von der Struktur der Aminosäuren außerordentlich abhängig war.

Summary

The reaction of α -amino acids with pyruvic acid has been studied in neutral solution in the presence of copper ions (II) and pyridine. In a nitrogen atmosphere, mainly transamination occurred with a little decarboxylation. In an oxygen atmosphere, varying degrees of deamination were observed and in some cases an extensive oxidative decarboxylation.

The transamination of a series of α -amino acids with pyruvic acid was carried out at 37 and 70° for 2, 4 and 6 hours and compared with the reaction not catalyzed by pyridine. The amount of ammonia produced in two hours at 37° has been determined with a modified method. In further Warburg-determinations, the amount of carbon dioxide produced under nitrogen and the oxygen uptake and the CO₂-production under air have been followed in the system copper sulphate-pyridine-pyruvic acid, with each of the amino acids, at 37°. It was shown, that the course of the reaction depends largely on the structure of the amino acids.

Dr. Hermann Mix, Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für Organische Katalyseforschung, Rostock, Buchbinderstr. 5-6.