

Tabelle 8.

Reduktion von terephthalsaurem Natrium bei konstantem pH.

Vers.-Nr.	Puffer	pH	Ausbeute an <i>p</i> -Toluylsäure in % d. Th.
1	Essigsäure-Natriumacetat	7.2—7.8	< 0.5
2	„	7.6—8.8	3.7
3	Borax-Borsäure	8.5—9.1	9
4	Phosphat-Gemisch	8.9—9.4	37
5	Glykokoll-NaOH	9.0—10.0	47
6	„	9.2—10.3	42
7	„	9.5—10.2	40
8	Borsäure-NaOH	9.8—10.3	19
9	Glykokoll-NaOH	10.0—11.5	18
10	sek. Phosphat-NaOH	10.8—11.0	17
11	„	11.8—11.9	16
12	tert. Phosphat-NaOH	12.8—13.2	< 1

gleiche Mengen des Ausgangsmaterials der Carboxyl-Reduktion und der Kern-Hydrierung. Als wir den Versuch Nr. 5 der Tabelle 8 wiederholten, um ihn nach 7 Min. abzubrechen, bestand das Gemisch der Reduktionsprodukte ebenso wie bei 1-stdg. Versuchsdauer zu je 50% d. Th. aus Toluylsäure und aus Hydro-terephthalsäuren:

Angew. 1.25 g terephthalsaures Natrium ..	0.99 g Säure
unverändert zurückgewonnen	0.48 g „
Gef. Hydro-terephthalsäuren	0.24 g = 49% d. Th.
Gef. <i>p</i> -Toluylsäure	0.20 g = 48% d. Th.

137. Richard Willstätter, Richard Kuhn und Eugen Bamann: Über asymmetrische Ester-Hydrolyse durch Enzyme. (I. Mitteilung.)

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissenschaften in München.]
(Eingegangen am 22. März 1928.)

Wird *rac.* Mandelsäure-äthylester durch Leber-Esterase gespalten, so findet man bei Unterbrechung der Hydrolyse rechtsdrehende Mandelsäure neben linksdrehendem Ester im Reaktionsgemisch¹⁾. Es liegt nahe zu schließen, daß der (+)-Ester²⁾ vom asymmetrischen Enzym rascher als der (–)-Ester angegriffen wird. Prüft man diese Folgerung,

¹⁾ H. D. Dakin, *Proceed. chem. Soc. London* **19**, 161 [1903]; *Journ. Physiol.* **30**, 253 [1904], **32**, 199 [1905].

²⁾ In den früheren Untersuchungen auf diesem Gebiete bedeuteten *d*- und *l*- den Drehungssinn von Ester und Säure. Da nach K. Freudenberg, F. Brauns und H. Siegel, *B.* **56**, 193 [1923], die Rechts-Mandelsäure der *l*-Reihe angehört, die absolute Konfiguration bei unseren Betrachtungen aber vorerst keine Rolle spielt, sollen von nun an die Symbole (+) und (–), und zwar für das Vorzeichen des Drehungsvermögens, Verwendung finden.

indem man unter gleichen Bedingungen Rechts- und Links-Ester einzeln als Substrate verwendet, so findet man entgegen aller Erwartung, daß das Enzym den (—)-Ester bevorzugt (Fig. 1 und 2).

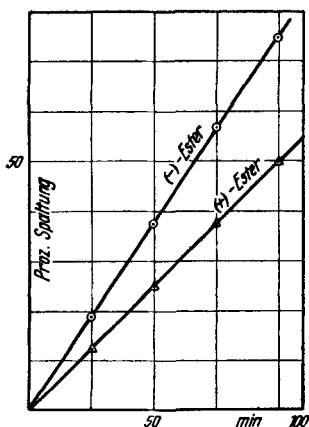


Fig. 1.
Einzeln wird der (—) - Ester
rascher gespalten.

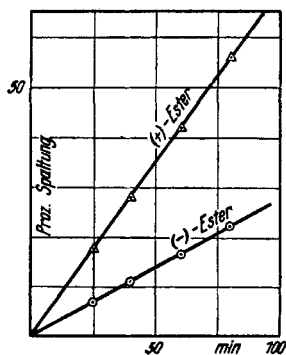


Fig. 2.
Im Gemisch eilt die Hydrolyse des (+)-Esters voran. Die Kurven sind aus dem spez. Drehungsvermögen der isolierten (+)-Mandelsäure errechnet.

Diese Feststellung hat Hr. F. Memmen mit uns schon im Sommersemester 1924 gemacht³⁾. Etwa gleichzeitig haben P. Rona und R. Ammon⁴⁾ dieselbe Erscheinung beobachtet und folgende Erklärungs-Möglichkeiten angeführt⁵⁾: „Diese merkwürdige Tatsache liegt vielleicht in dem eigentümlichen Wesen des Racemates begründet. Es könnte aber auch die Affinität des Ferments zu den beiden optisch aktiven Formen des Substrats verschieden sein und ferner nicht parallel gehen mit den Zerfallsgeschwindigkeiten der *d*- bzw. *l*-Substrat-Ferment-Verbindung. (Fußnote: Auf diese Möglichkeit hat uns Hr. H. H. Weber aufmerksam gemacht).“

Bei uns stand von Anfang an die zweite Erklärungs-Möglichkeit im Vordergrund, zumal sie den auf L. Michaelis und M. L. Menten⁶⁾ fußenden allgemeinen Betrachtungen R. Kuhns⁷⁾ über die Spezifität von Enzymen entspringt. Demgemäß wird das Verhältnis der Geschwindigkeiten, mit denen (+)- und (—)-Mandelsäure-ester im Gemisch (Racemat) gespalten werden, bedingt sein: 1. durch das Verhältnis der Affinitäten, welche die Esterase

³⁾ Entsprechende Versuche mit Pankreas-Lipase wurden erstmals beschrieben von R. Willstätter und F. Memmen, *Ztschr. physiol. Chem.* **138**, 216 [1924], u. zw. S. 252. Durch Pankreas-Enzym wird sowohl einzeln als auch im Gemisch der Links-Ester schneller als der Antipode gespalten.

⁴⁾ *Biochem. Ztschr.* **181**, 49 [1926/27].

⁵⁾ a. a. O., S. 70.

⁶⁾ *Biochem. Ztschr.* **49**, 333 [1913].

⁷⁾ *Ztschr. physiol. Chem.* **125**, 1, 28 [1922/23]; *Naturwiss.* **1923**, 732; C. Oppenheimer, R. Kuhn, *Die Fermente*, 5. Aufl., I, Leipzig 1925, S. 193ff. Überlegungen ähnlicher Art hatte schon K. Fajans angestellt (Dissertat., Heidelberg 1910; *Ztschr. physikal. Chem.* **75**, 232 [1910]), um die Synthese von optisch aktivem Benzaldehyd-cyanhydrin durch Emulsin zu erklären.

gegenüber (+)- und (-)-Ester betätigt, z. durch das Verhältnis der Geschwindigkeiten, mit denen die Esterase-(+)-Ester- und Esterase-(-)-Ester-Verbindung hydrolytisch zerfällt.

Was bisher unter „optischer Spezifität“ von Esterasen verstanden wurde, ist eine komplexe Erscheinung, in der die beiden genannten Einflüsse gleichzeitig zur Geltung kommen.

Die relative Spezifität der Saccharase gegenüber Rohrzucker und Raffinose wurde quantitativ abgeleitet aus den Dissoziationskonstanten und den spezifischen Zerfallsgeschwindigkeiten der Verbindungen, die das Enzym mit dem Di- und Trisaccharid eingeht⁸⁾. In der vorliegenden Abhandlung, deren Vollendung durch äußere Umstände lange verzögert wurde, wird die optische Spezifität der Leber-Esterase in entsprechender Weise aus den Dissoziationskonstanten und Hydrolysegeschwindigkeiten der Reaktions-Zwischenprodukte erklärt. „Die Zerlegung in Glieder, von denen jedes für sich nur die Zusammensetzung oder Konzentration, die Bildungs- oder Zerfallsgeschwindigkeit der Reaktions-Zwischenprodukte betrifft, das ist es, was wir von einer rationellen Dynamik der Ferment-Reaktionen in der nächsten Zukunft erhoffen.“⁹⁾

In den Untersuchungen über Carbohydrasen, die unter diesem Gesichtspunkt durchgeführt wurden, ergab sich, daß aus dem Substrat mit größerer Affinität in der Regel auch die Enzym-Substrat-Verbindung mit größerer Zerfallsgeschwindigkeit gebildet wird. Abweichungen von der Parallelität dieser an sich durchaus unabhängigen Größen, wie sie bei der Spaltung von Maltose und α -Methyl-glucosid durch Hefe-Auszüge zur Beobachtung gelangten¹⁰⁾, waren zu erwarten. Sie boten aber dort wenig Interesse. Bei den Esterasen erlangen sie entscheidende Bedeutung.

Wir finden nämlich, wenn (+)- und (-)-Ester einzeln als Substrat benützt werden, nur im Gebiete verhältnismäßig hoher Ester-Konzentrationen die linksdrehende Verbindung von der Esterase bevorzugt. Bei einer Konzentration von 0.001 Mol. Mandelsäure-ester im Liter ist die Geschwindigkeit für beide Antipoden annähernd gleich, und in noch verdünnteren Lösungen kehrt sich das Verhältnis um: In 0.0001-n. Lösung wird der (+)-Ester 1.7-mal rascher verseift als der (-)-Ester, während in 0.025-n. Lösung der (-)-Ester 1.6-mal rascher reagiert. In Fig. 3, die zu Tabelle III gehört, sind die in gleichen Zeiten gebildeten Mandelsäure-Mengen als Funktion des Logarithmus der reziproken Substrat-Konzentration ($-\log [S]$) aufgetragen. Sie stellen ein direktes Maß der Reaktionsgeschwindigkeiten dar, da der zeitliche Verlauf der Hydrolysen bis zu sehr hohen Spaltungsgraden genau linear ist (Fig. 1). Aus Fig. 3 läßt sich der Quotient:

$$Q = \frac{\text{Geschw. der } (-)\text{-Ester-Spaltung}}{\text{Geschw. der } (+)\text{-Ester-Spaltung}}$$

als Funktion von $-\log [S]$ ableiten. Es ergibt sich das in Fig. 4 dargestellte Bild. Man erkennt, daß im Bereich sehr niedriger Ester-Konzentrationen

⁸⁾ Gleichartige Untersuchungen über α - und β -Glucosidasen liegen vor von R. Willstätter, R. Kuhn und H. Sobotka, Ztschr. physiol. Chem. **129**, 33 [1923], **134**, 224 [1923/24].

⁹⁾ C. Oppenheimer-R. Kuhn, Die Fermente, 5. Aufl., I., Leipzig 1925, S. 177.

¹⁰⁾ R. Willstätter, R. Kuhn und H. Sobotka, Ztschr. physiol. Chem. **134**, 224 [1923/24].

$Q < 1$ ist, entsprechend der größeren Verseifungsgeschwindigkeit des (+)-Esters, daß aber mit steigender Substrat-Konzentration $Q > 1$ wird und dann der (–)-Ester bevorzugt wird. Der Maximalwert von Q beträgt 1.6. Bei noch höheren Ester-Konzentrationen nimmt Q wieder ab. Diese Werte, die schon ins Sättigungsgebiet der Ester-Lösungen fallen, glauben wir bei der quantitativen Auswertung vernachlässigen zu müssen.

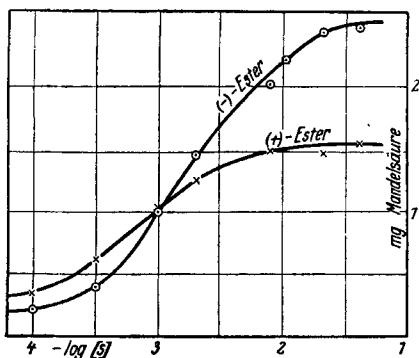


Fig. 3.
Aktivitäts- p_s -Kurven.

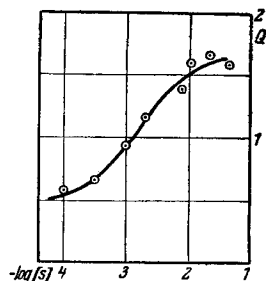


Fig. 4.
Einfluß der Substrat-Konzentration auf das Verhältnis der Hydrolysen-geschwindigkeiten.

Die Dissoziationskonstanten:

$$K_{(+)} = \frac{[\text{Esterase}] \times [(\text{+})\text{-Mandelsäure-ester}]}{[\text{Esterase-(+)-Ester-Verbindung}]}$$

$$\text{und } K_{(-)} = \frac{[\text{Esterase}] \times [(\text{-})\text{-Mandelsäure-ester}]}{[\text{Esterase-(–)-Ester-Verbindung}]}$$

entsprechen den Wendepunkten der p_s -Kurven in Fig. 3, welche auf halber Höhe der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten liegen⁶⁾. Letztere ergeben sich durch Extrapolieren auf sehr hohe Substrat-Konzentration für den (–)-Ester zu 2.6 mg, für den (+)-Ester zu 1.6 mg Mandelsäure, die durch 0.4 I₁'-E.¹¹⁾ bei $p_{\text{H}} = 7$ und 25⁰ in 25 Min. gebildet werden. Daraus folgt:

$$-\log K_{(+)} = 3.3$$

$$\text{und } -\log K_{(-)} = 2.8.$$

Die Affinität der Esterase zum (+)-Ester ist also 3.2-mal größer als zum (–)-Ester.

Umgekehrt zerfällt aber die Esterase-(–)-Ester-Verbindung 1.6-mal rascher als die Esterase-(+)-Ester-Verbindung. Das Verhältnis:

$$k_{(-)} : k_{(+)} = 1.6 : 1$$

ergibt sich unmittelbar aus den für sehr hohe Substrat-Konzentrationen extrapolierten Geschwindigkeiten.

Aus dem Verhältnis der Affinitäten und dem der Zerfallsgeschwindigkeiten folgt die Erklärung des anscheinenden Widerspruchs (Fig. 1 und Fig. 2),

¹¹⁾ Diese Lipase-Einheiten (Substrat: Buttersäure-methylester) haben R. Willstätter und F. Memmen, Ztschr. physiol. Chem. 188, 216 [1924], u. zw. S. 227, vorgeschlagen.

der zwischen dem Verhalten des Racemats und dem der optischen Komponenten besteht: Obwohl der Links-Ester allein schneller gespalten wird als der Rechts-Ester, wird bei der Hydrolyse des Gemisches der Rechts-Ester bevorzugt, weil seine Affinität zur Esterase diejenige des Antipoden 3.2-fach übertrifft, während das Verhältnis der Hydrolysegeschwindigkeiten nur 1.6:1 zugunsten der Esterase-Linksester-Verbindung beträgt.

Bei relativ hoher Substrat-Konzentration, die hier schon in 0.01-n. Lösung vorliegt, wird sich das Enzym gemäß dem Verhältnis seiner Affinitäten $1/K$ auf (+)- und (-)-Ester verteilen, so daß das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten bei Anwendung des Gemisches:

$$v(+)/v(-) = k(+)/k(-) \times K(-)/K(+) = 1/1.6 \times 3.2/1 = 2.0$$

zugunsten des (+)-Esters liegen wird. Die Zahl 2.0 ist zu vergleichen mit dem Verhältnis $v(+):v(-)$, das aus dem spezifischen Drehungsvermögen der Mandelsäure folgt, die bei Unterbrechung der Racemat-Spaltung erhalten wird.

Wir haben gefunden, daß innerhalb der untersuchten Grenzen ($p_H = 6.0$ bis $p_H = 8.0$) die optische Aktivierung des rac. Mandelsäure-esters von der Wasserstoff-Ionen-Konzentration, sowie von der Menge des angewandten

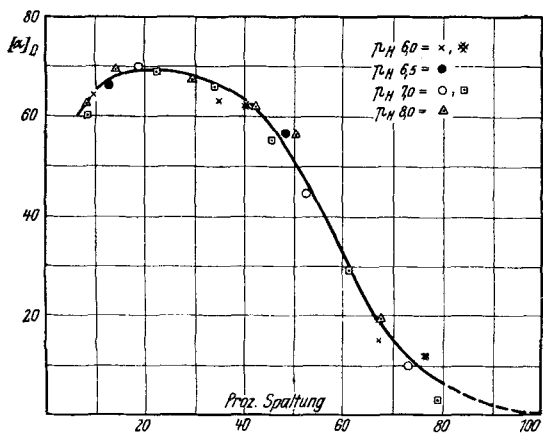


Fig. 5.

Das spezifische Drehungsvermögen der Mandelsäure als Funktion des Spaltungsgrades bei verschiedenem p_H .

einer Erklärung¹²⁾. Die höchsten $[\alpha]_D$ -Werte betragen $+70^\circ$. Daraus berechnet sich, daß zu Beginn der Reaktion neben je 1 Mol. (-)-Ester 2.6

Enzyms (1:3) unabhängig ist (Fig. 5), und daß für das spez. Drehungsvermögen der entstehenden Mandelsäure nur der erzielte Spaltungsgrad bestimmend ist. Mit Rücksicht auf den linearen zeitlichen Verlauf des Umsatzes sollte das in den allerersten Reaktionsstadien zu beobachtende $[\alpha]_D$ der Mandelsäure längere Zeit konstant bleiben und erst absinken, wenn die Hauptmenge des (+)-Esters verbraucht ist. Der Anstieg der $[\alpha]_D$ -Kurve in Fig. 5 bei kleinen Spaltungsgraden bedarf noch

¹²⁾ Die Ursache vermuten wir in dem Abfall der Q-Kurve (Fig. 4) bei höheren Substrat-Konzentrationen. Wenn, wie für die Versuche der Tab. I (Fig. 5), Ester-Lösungen verwendet werden, die mehr als 0.02 Mol/Liter enthalten, so muß bei fortschreitender Spaltung $v(+):v(-)$ anfangs etwas zunehmen.

Mol. (+)-Ester zerfallen. Das Verhältnis $v(+):v(-)$ für die Hydrolyse des Gemisches beträgt nämlich auf Grund der optischen Daten:

$$v(+):v(-) = (155 + 70):(155 - 70) = 2.6_{\max.}$$

worin 155 das $[\alpha]_D$ der reinen Mandelsäure bedeutet¹³⁾.

Aus der befriedigenden Übereinstimmung dieser Zahl mit der oben auf theoretischem Wege abgeleiteten (2.0) ist zu schließen, daß im Gebiete sehr verdünnter Lösungen die Beziehungen zwischen der Leber-Esterase und den aktiven Mandelsäure-estern sehr annähernd durch das Massenwirkungsgesetz geregelt werden. Es ist möglich, aus Titrationsversuchen allein die polarimetrischen Befunde bei der Racemat-Spaltung mit großer Annäherung vorauszusagen.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft drücken wir unseren aufrichtigen Dank aus für die Förderung dieser Arbeit durch ein (Hrn. E. Bamann gewährtes) Forschungs-Stipendium.

Beschreibung der Versuche.

1. Substrate.

rac. Mandelsäure-äthylester wurde mehrfach aus Petroläther umkrystallisiert. Selbst 3-maliges vorsichtiges Umkrystallisieren gibt noch keine Gewähr für die Erzielung eines „induktionsfreien“ Präparats¹⁴⁾. Wir empfehlen — auch für die Antipoden — sehr viel Lösungsmittel anzuwenden.

(+)-Mandelsäure-äthylester: Das Cinchonin-Salz der (+)-Mandelsäure¹⁵⁾ wurde 3-mal aus Wasser umkrystallisiert und die daraus in Freiheit gesetzte Säure (40% d. Th.) aus Benzol umkrystallisiert, wobei sie in optisch reiner Form erhalten wurde:

$$[\alpha]_D^{18} = (+2.19^0 \times 100) : (2 \times 0.6997) = +156.5^0 \text{ (in Wasser).}$$

Der Ester wurde nach R. Willstätter und F. Memmen¹⁶⁾ aus dem Silbersalz mit Jodäthyl erhalten. Nach 2-maliger Krystallisation aus Petroläther fanden wir:

$$[\alpha]_D^{20} = (+2.80^0 \times 100) : (2 \times 0.6825) = +205.1^0 \text{ (in CS}_2\text{).}$$

Der Schmp. lag bei $31.3^{017)}$.

(-)-Mandelsäure-äthylester: Die Bereitung des Morphin-Salzes geschah nach A. McKenzie¹⁸⁾, übereinstimmend mit den zusammen-

¹³⁾ Extrapoliert man die $[\alpha]_D$ -Kurve (Fig. 5) auf 0% Spaltung unter Berücksichtigung der Konzentrations-Abhängigkeit von Q (Fig. 4), so ergibt sich $[\alpha]_D$ zu etwa $+50^0$ ($t=0$). Daraus folgt:

$$v(+):v(-) = (155 + 50):(155 - 50) = 2.0 \text{ extrapol.}$$

¹⁴⁾ Über die Erscheinung der „Induktion“ vergl. R. Willstätter, R. Kuhn, O. Lind und F. Memmen, Ztschr. physiol. Chem. **167**, 303 [1927].

¹⁵⁾ B. **16**, 1568 [1883], **32**, 2385 [1899]; Journ. chem. Soc. London **75**, 964 [1899].

¹⁶⁾ Ztschr. physiol. Chem. **138**, 216 [1924], u. zw. S. 253.

¹⁷⁾ Herausragender Faden = $8^0 = 4.16 \text{ cm}$; Außentemp. = 20^0 .

¹⁸⁾ Journ. chem. Soc. London **75**, 964 [1899].

fassenden Angaben von P. Rona und R. Ammon. Die Ausbeute an optisch reiner (–)-Säure betrug 40% d. Th.

$$[\alpha]_D^{18} = (-2.03^0 \times 100) : (2 \times 0.6464) = -157.1^0 \text{ (in Wasser).}$$

Der aus dem Silbersalz mit Jodäthyl gewonnene Ester schmolz nach 2-maliger Krystallisation aus viel Petroläther bei 31.3⁰⁴.

2. Enzym-Material.

Nach dem neuen vereinfachten Verfahren von R. Willstätter, E. Bamann und J. Waldschmidt-Graser¹⁹⁾ wurde Leber-Pulver vom Schwein mit der 50-fachen Menge $n_{/40}$ -Ammoniak etwa 1 Stde. ausgezogen und das Filtrat mit Essigsäure vorsichtig angesäuert. Die vom ausfallenden Niederschlag abzentrifugierte Enzym-Lösung wurde 4 Tage der Dialyse in Hammel-Blinddärmen gegen fließendes destilliertes Wasser unterworfen. Die filtrierte, schwach bräunlich gefärbte, klare Lösung diente für die Versuche. Die Wirksamkeit, die wir vor Beginn jeder Versuchsreihe erneut bestimmten, blieb viele Monate absolut konstant, wobei wir die Lösung, mit Toluol überschichtet, im Eisschrank aufbewahrten. Der Reinheitsgrad des dialysierten Auszuges war E. W. = 2.6 gegenüber 0.3 für das angewandte Leber-Pulver, entsprechend einer mehr als 8-fachen Verbesserung.

3. Methodik und Messungs-Ergebnisse.

p_H-Abhängigkeit der optischen Spezifität.

Will man die auswählende Wirkung der Esterase gegenüber den spiegelbildlichen Estern im Racemat bei wechselnden Aciditäten vergleichen, so muß berücksichtigt werden, daß das spezifische Drehungsvermögen der gebildeten Säure, sowie dasjenige des noch unverseiften Esters vom erzielten Spaltungsgrad abhängt. Wir stellen aus diesem Grunde in Fig. 5 das $[\alpha]_D$ der bei verschiedenem p_H isolierten Mandelsäure als Funktion des titrimetrisch ermittelten Spaltungsgrades dar.

Die betreffenden Messungen (Tab. I) wurden in starken Phosphat-Puffern bei 25⁰ ausgeführt. Die Phosphat-Konzentration (2 g auf 50 ccm) war so hoch bemessen, daß bei vollständiger Hydrolyse des Esters (0.25 g *rac.* Mandelsäure-äthylester auf 50 ccm) die p_H-Verschiebung nicht mehr als 0.1 betragen konnte. Nach den in der Tabelle verzeichneten Zeiten wurden je 50 ccm der Versuchslösung abpipettiert, schwach soda-alkalisch gemacht und ausgeäthert. Die vom unverseiften Ester befreite Lösung säuerten wir mit Phosphorsäure stark an, um ihr nach Sättigung mit Ammoniumsulfat die Mandelsäure durch Ausäthern zu entziehen. Die nach dem Verdampfen der getrockneten Äther-Auszüge hinterbleibende Säure wurde in 10 ccm Wasser gelöst, im 2-dm-Rohr polarisiert und mit $n_{/10}$ -Kalilauge titriert. Der Reinheitsgrad des angewandten Enzyms entsprach L. W. = 2.2. Die Zahl der Lipase-Einheiten (L. E.) ist bei jedem Versuch in der Tabelle verzeichnet.

¹⁹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **173**, 155 [1927/28] u. zw. S. 160.

Tabelle I.
Analyse der Mandelsäure, die bei wechselndem p_H aus dem
rac. Ester gebildet wird.

p_H	Ester	Enzym- Menge (L. E.)	Reaktions- dauer (Stdn.)	Drehungs- winkel	Spaltung (%)	$[\alpha]_D$ der Mandelsäure
6.0	I	1.25	10.5	+ 0.25 ⁰	9.2	+ 64.4 ⁰
6.0	I	1.25	24	+ 0.93 ⁰	35.0	+ 62.9 ⁰
6.0	I	1.25	60	+ 0.42 ⁰	67.1	+ 14.8 ⁰
6.0	II	2.50	8.5	+ 1.06 ⁰	40.2	+ 62.2 ⁰
6.0	II	2.50	18.8	+ 0.40 ⁰	77.0	+ 12.2 ⁰
6.5	I	1.25	10.5	+ 0.35 ⁰	12.6	+ 65.8 ⁰
6.5	I	1.25	24	+ 1.17 ⁰	48.8	+ 56.9 ⁰
7.0	I	1.25	10.5	+ 0.56 ⁰	18.9	+ 70.0 ⁰
7.0	I	1.25	24	+ 0.98 ⁰	52.5	+ 44.2 ⁰
7.0	I	1.25	36	+ 0.30 ⁰	72.9	+ 9.7 ⁰
7.0	II	3.75	1	+ 0.22 ⁰	8.6	+ 60.1 ⁰
7.0	II	3.75	2.5	+ 0.65 ⁰	22.4	+ 68.9 ⁰
7.0	II	3.75	3.5	+ 0.95 ⁰	34.0	+ 66.2 ⁰
7.0	II	3.75	5	+ 1.05 ⁰	45.5	+ 54.7 ⁰
7.0	II	3.75	7	+ 0.75 ⁰	61.4	+ 29.0 ⁰
7.0	II	3.75	9	+ 0.10 ⁰	79.5	+ 3.0 ⁰
8.0	II	2.50	1	+ 0.20 ⁰	7.6	+ 62.4 ⁰
8.0	II	2.50	2	+ 0.40 ⁰	13.7	+ 69.0 ⁰
8.0	II	2.50	4.25	+ 0.83 ⁰	29.5	+ 66.8 ⁰
8.0	II	2.50	6.25	+ 1.10 ⁰	42.2	+ 61.7 ⁰
8.0	II	2.50	7.25	+ 1.20 ⁰	50.5	+ 56.2 ⁰
8.0	II	2.50	10.25	+ 0.54 ⁰	67.2	+ 19.0 ⁰

Bei $p_H=8.0$ waren für die hydrolysierende Wirkung des Phosphat-Puffers Korrekturen anzubringen, die in Kontrollversuchen bestimmt wurden und in obiger Tabelle bereits berücksichtigt sind. Da der ursprünglich verwendete Ester (I) nicht ganz frei von Benzoyl-ameisensäure-ester war und Induktion zeigte, wurde eine weitere Versuchsreihe mit sehr sorgfältig gereinigtem, induktionsfreiem Ester (II) durchgeführt. Die Ergebnisse stimmen, wie aus Fig. 5 hervorgeht, gut überein. j

Affinitäts-Bestimmungen.

Der Einfluß der Substrat-Konzentration auf die Hydrolyse von (+)- und (-)-Mandelsäure-ester wurde titrimetrisch in puffer-freien Lösungen bei konstantem $p_H = 7.0-7.1$ nach R. Willstätter, R. Kuhn, O. Lind und F. Memmen bestimmt. Zu 50 ccm Reaktionsgemisch gaben wir 5 Tropfen einer 1-proz. Lösung von Bromthymolblau in Alkohol und ließen aus einer Bürette tropfenweise die zur Aufrechterhaltung des Farbtones erforderliche Menge Kalilauge zufließen. Der Farbton wurde dauernd mit dem einer Lösung von konstantem p_H , die sich im selben Thermostaten (25⁰) befand, gegen einen weißen Hintergrund bei guter Beleuchtung verglichen.

Da sich die Versuche bis zu sehr niedrigen Ester-Konzentrationen erstrecken mußten, benützten wir Radium-Büretten und stufen den Titer der Maßlösung, den Ester-Konzentrationen entsprechend, bis auf 0.005-n. ab. Die große Genauigkeit der so erhältlichen Resultate geht aus den folgenden Tabellen und Figuren hervor.

Tabelle II. Vergleich der Hydrolysen von Rechts-, Links- und *rac.* Mandelsäure-äthylester bei relativ hoher Substrat-Konzentration.

Auf je 50 ccm Ester-Lösung wirkten bei 25° und pH = 7 in allen Fällen 10 L₁-E. Bei den höchsten Ester-Konzentrationen war die Sättigungsgrenze noch nicht erreicht.

Die Zahlen bedeuten Minuten, die zur Spaltung von 10 %, 20 % usw. erforderlich waren.

Substrat	Links-Ester				Rechts-Ester				<i>racem.</i> Ester			
	g Ester in 50 ccm	0.0938	0.188	0.375	0.75	0.0938	0.188	0.375	0.75	0.0938	0.188	0.375
Normalität der Lauge	0.05	0.1	0.2	0.4	0.05	0.1	0.2	0.4	0.05	0.1	0.2	0.4
10 %	2'	4	11	33	6	11	20	40	7	12	21	47
20 %	7	13	26	67	11.5	22	40.5	80	13.5	24	41	95
30 %	10.5	19	40	101	17.5	33	61	120	20.5	35.5	61	143
40 %	14	26	53	135	23	44	71	165	27	47	81.5	191
50 %	17.5	32	66.5	169	29	54.5	102	213	34	59	101.5	239
60 %	21	38.5	80	203	43.5	65	122	260	40.5	70.5	122	287
70 %	25	45	93.5	237	40	77	143	309	47	82	142	337
80 %	28.5	53	108	276	46	90	163	358	54	94	162	387
90 %	34	61	124	318	52	102	185	410	61	106	183	437

Die Versuche mit relativ niedrigen Substrat-Konzentrationen, aus denen die Affinitäten des Enzyms zu Rechts- und Links-Ester berechnet wurden, sind in den Figuren 6—8 wiedergegeben.

Fig. 6. Links-Mandelsäure-ester.

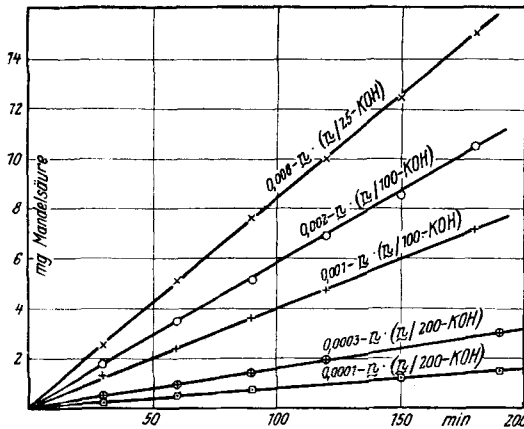
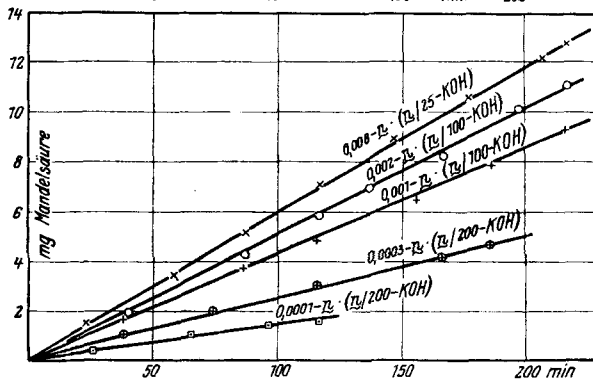


Fig. 7. Rechts-Mandelsäure-ester.



Aus diesen Figuren und aus Tabelle II sind die Aktivitäts- p_H -Kurven konstruiert worden (Fig. 3). In Tabelle III wird zusammenfassend das Ergebnis der Affinitätsmessungen mitgeteilt.

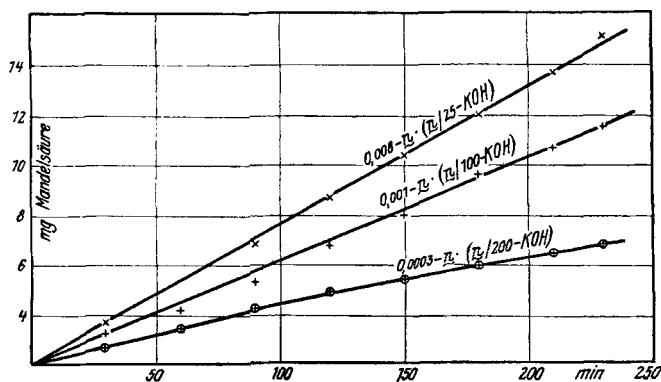


Fig. 8.
Racem. Mandelsäure-ester.

Tabelle III.

Einfluß der Substrat-Konzentration [S] auf die Hydrolyse von (+)- und (-)-Mandelsäure-äthylester.

Auf 50 ccm Ester-Lösung je 0.4 L_1' -E. bei $p_H = 7$ und 25° .

—log [S]	In 25 Min. gebildete Mandelsäure (mg) aus		—log [S]	In 25 Min. gebildete Mandelsäure (mg) aus	
	(-)-Ester	(+)-Ester		(-)-Ester	(+)-Ester
[0.779]	[2.29]	[1.77]	2.10	2.08	1.49
[1.080]	[1.90]	[1.58]	2.70	1.45	1.25
1.381	2.47	1.55	3.00	1.00	1.06
1.682	2.44	1.46	3.50	0.40	0.63
1.983	2.21	1.37	4.00	0.21	0.36

Die Werte in eckiger Klammer, die in der Nähe des Sättigungszustandes der Ester-Lösungen liegen, sind in Fig. 3 unberücksichtigt gelassen.

138. Elias Hollo: Untersuchungen über den Einfluß des Ring-Sauerstoffatoms auf die Reaktionsgeschwindigkeit gewisser Lactone.

(Eingegangen am 8. März 1928.)

Heterocyclen, in denen neben Kohlenstoff Sauerstoff an der Ringbildung beteiligt ist, kommen sehr häufig in Kohlenhydraten vor¹⁾; das Interesse an den entsprechenden einfachen Ringverbindungen, die bisher noch verhältnismäßig wenig erforscht sind, ist daher im Wachsen.

¹⁾ siehe z. B.: Amé und Jaques Pictet, *Helv. chim. Acta* **4**, 788 [1921]; Bergmann, Miekeley und Stather, *B.* **56**, 2255 [1923]; Pictet und Stricker, *Helv. chim. Acta* **7**, 711 [1924]; Irvine und Mitarbeiter, *C.* **1926**, II 1264.