

deuten z. B. folgende Beobachtungen: Wie aus Kurve I zu ersehen ist, halten 1.75 g Rohrzucker/100 ccm ebensoviel $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in Lösung wie 0.75 g Rohrzucker/100 ccm. Als aber ein Gemisch von 17.5 ccm obiger Zucker-Lösung + 7.5 ccm Wasser + 50 ccm *n*-NaOH-Lauge aus einer Bürette rasch und unter Umschütteln mit der für die vorstehenden Versuche verwendeten CaCl_2 -Lösung versetzt wurde, ging das beim Zusammentreffen der Flüssigkeiten zunächst entstehende $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sofort in Lösung; erst nach Zusatz von 18.0 ccm CaCl_2 -Lösung trat ziemlich plötzlich eine dauernde Abscheidung auf. Dagegen ergab sich beim entsprechenden Versuch mit 7.5 ccm Zucker-Lösung + 17.5 ccm Wasser unter sonst gleichen Umständen schon nach Zusatz von weniger als 1 ccm CaCl_2 -Lösung dauernde Trübung.

Da mir zurzeit die Untersuchung der obigen Fragen nicht möglich ist, begnüge ich mich mit dieser Mitteilung in der Hoffnung, dadurch die Anregung zu weiterer Klärung der Angelegenheit gegeben zu haben.

Leipzig, 19. April 1929.

239. Eugen Bamann: Über die Konfigurations-Spezifität der Leber-Esterase verschiedener Tiere und ihre Abhängigkeit von der Substrat-Konzentration. (Zweite Mitteilung „Über asymmetrische Ester-Hydrolyse durch Enzyme“ in der von R. Willstätter, R. Kuhn und E. Bamann begonnenen Untersuchungsreihe).

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akad. d. Wissenschaften, München.]

(Eingegangen am 19. April 1929.)

Einleitung.

Die erste¹⁾ Untersuchung dieser Reihe hat zu dem Ergebnis geführt, daß die von H. D. Dakin²⁾ aufgefundene Erscheinung der optischen Spezifität der Leber-Esterase, die in der Folgezeit insbesondere von R. Willstätter³⁾, sowie P. Rona⁴⁾ in Bezug auf Enzym-Material und Substrate erweitert wurde, aus den Dissoziationskonstanten und den Zerfallsgeschwindigkeiten der Reaktions-Zwischenprodukte erklärt werden kann. „Was bisher unter ‚optischer Spezifität‘ von Esterasen verstanden wurde, ist eine komplexe Erscheinung, in der die beiden genannten Einflüsse gleichzeitig zur Geltung kommen.“ Diese Erkenntnis weist die Erforschung der lipatischen Enzyme in neue Bahnen. Man darf erwarten, daß durch reaktions-

¹⁾ R. Willstätter, R. Kuhn und E. Bamann, Über asymmetrische Ester-Hydrolyse durch Enzyme (I. Mitteil.), B. **61**, 886 [1928].

²⁾ Proceed. chem. Soc. London **19**, 161 [1903]; Journ. Physiol. **30**, 253 [1903/1904], **32**, 199 [1905].

³⁾ R. Willstätter und F. Memmen (VIII. Abhandl. über Pankreas-Enzyme), Ztschr. physiol. Chem. **138**, 216 [1924]; R. Willstätter, F. Haurowitz und F. Memmen (IX. Abhandl.), Ztschr. physiol. Chem. **140**, 203 [1924]; R. Willstätter und H. Kumagawa (XIV. Abhandl.), Ztschr. physiol. Chem. **146**, 151 [1925]; R. Willstätter, E. Bamann und J. Waldschmidt-Graser (XVII. Abhandl.), Ztschr. physiol. Chem. **173**, 155 [1928].

⁴⁾ P. Rona und R. Annon, Biochem. Ztschr. **181**, 49 [1927]; P. Rona und R. Itelsohn-Schechter, Biochem. Ztschr. **197**, 482 [1928]; P. Rona und R. Itelsohn-Schechter, Biochem. Ztschr. **203**, 293 [1928].

kinetische Untersuchungen die grundlegenden Arbeiten früherer Forscher ergänzt und unsere Kenntnis von der Natur dieser Katalysatoren weiter gefördert wird.

Ich danke meinem hochverehrten Lehrer, Hrn. Geheimen Rat Prof. Dr. Richard Willstätter, sowie Hrn. Prof. Dr. Richard Kuhn aufrichtig für die Förderung, die ich bei Inangriffnahme dieses Arbeitsgebietes gefunden habe.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung ist, die am Beispiel der Leber-Esterase des Schweines⁵⁾ gewonnenen Erfahrungen an weiterem Enzym-Material zu prüfen, und zwar an den Esterasen eines Organs, der Leber, verschiedener Tiere.

Es hat sich bestätigen lassen, daß „im Gebiete sehr verdünnter Lösungen die Beziehungen zwischen der Leber-Esterase und den aktiven Mandelsäure-estern sehr annähernd durch das Massenwirkungsgesetz geregelt werden“, und daß es möglich ist, „aus Titrationsversuchen allein die polarimetrischen Befunde bei der Racemat-Spaltung mit großer Annäherung vorauszusagen.“ Es kommt nämlich eine bisher noch nicht beobachtete Erscheinung hinzu, nämlich eine Abhängigkeit des optischen Auswählens von der Substrat-Konzentration⁶⁾. Diese Abhängigkeit erweist sich hinsichtlich der Größe und sogar des Sinnes der spezifischen Drehung der gebildeten Säure als begründet in dem reaktionskinetischen Verhalten der aktiven Komponenten. Weiterhin wird die Klärung der Frage vorbereitet, ob es möglich ist, die lipatischen Enzyme nach einheitlichen Gesichtspunkten in eine oder einige Gruppen einzuordnen.

In der Schafleber-Esterase ist ein der Schweineleber-Esterase in kinetischer Hinsicht äußerst ähnliches Enzym gefunden worden. Bei Esterasen anderer Tiere sind die Messungs-Ergebnisse nicht ausreichend, da die beschränkte Löslichkeit der Ester die Verfolgung der Aktivitäts- p_s -Kurve im Gebiet hoher Konzentrationen ganz oder teilweise vereitelt.

Vor kurzem haben H. H. Weber und R. Ammon⁷⁾ eine Untersuchung veröffentlicht, welche im wesentlichen die gleiche Frage wie die I. Mitteilung behandelt. Bezüglich Leber-Esterase des Schweines haben die Autoren die Ergebnisse am Methylester der Mandelsäuren bestätigt. Vergleichende Messungen mit dem Pankreas-Enzym des Schweines ergaben, daß das Verhältnis der Hydrolysen-Geschwindigkeiten der Reaktions-Zwischenprodukte das gleiche ist. H. H. Weber und R. Ammon fassen dieses Resultat dahin zusammen: „Die optische Zerfalls-Spezifität, die allein Rückschlüsse auf den Bau des eigentlichen Ferment-Moleküls gestattet, ist bei den beiden Lipasen nicht nur der Richtung, sondern dem Umfang nach völlig gleich“, und sie vermuten in der Zerfallsgeschwindigkeit der Esterase-Ester-Verbindungen denjenigen Faktor, der erlaubt, die Frage nach der Identität oder Verschiedenheit der fettsplattenden Enzyme zu entscheiden.

⁵⁾ In der ersten Mitteilung ist im einleitenden Satz nur von „Leber-Esterase“ gesprochen. Gemeint ist Leber-Esterase des Schweines, wie aus den nachfolgenden Angaben über das „Enzym-Material“ ersichtlich wird.

⁶⁾ In qualitativen Beobachtungen hatten R. Willstätter und O. Lind schon in den Jahren 1924 und 1925 bemerkt, daß eine Abhängigkeit des optischen Auswählens von der Konzentration des Substrats besteht. ⁷⁾ Biochem. Ztschr. 204, 197 [1929].

Die Untersuchung dieser wichtigen Frage wird auf einer breiteren Basis aufzubauen sein. Einerseits bedarf es einer Erweiterung hinsichtlich des Enzym-Materials. Pankreas- und Magen-Lipase müssen in den Kreis der Untersuchung einbezogen werden. Andererseits sind die Affinitätsmessungen auf weitere aktive Substrate auszudehnen. Denn es ist möglich, daß die bisherige Annahme⁸⁾, zwei Enzyme seien verschieden, wenn sie bei dem einen Racemat den gleichen Antipoden, bei dem zweiten dagegen die Komponenten von entgegengesetztem Drehungssinn bevorzugen, einer Korrektur unterzogen werden muß. Dann wird man auch mit größerer Sicherheit als bisher zu der Ansicht von Dakin Stellung nehmen können, daß das Leber-Enzym die Ester von *d*-Mandelsäure und denjenigen Derivaten rascher spaltet, die in ihrer absoluten Konfiguration übereinstimmen, gleichgültig welchen Drehungssinn sie besitzen⁹⁾. Zur Vervollständigung des reaktionskinetischen Bildes der Lipasen gehört endlich ein Vergleich der Enzyme in verschiedenen Reinheitsstufen. Wenn es gelänge, eine Abhängigkeit der Affinitäten von den begleitenden natürlichen Stoffen aufzudecken, wäre ein Gegenstück gefunden zu den von R. Kuhn¹⁰⁾ untersuchten Hefe-Saccharasen, deren Affinitäten sich im Gange der Reinigungs-Operationen nicht ändern. Die ange deuteten Fragen sind für die Fortsetzung der begonnenen Untersuchungsreihe vorbehalten.

Beschreibung der Versuche.

I. Enzym-Material und Substrate.

Untersucht wurde die Leber-Esterase vom Schaf, Kaninchen, Hund, Rind, Pferd und vom Menschen.

Als Ausgangsmaterial zur Darstellung der Enzym-Lösungen bewährten sich Trockenpräparate, dargestellt aus der Leber nur eines einzigen Tieres nach der Vorschrift der II.¹¹⁾ und XVII.¹²⁾ Abhandlung über Pankreas-Enzyme. Daraus ließen sich durch 1-stdg. Extraktion mit der 50-fachen Menge $n/_{40}$ -Ammoniak Auszüge gewinnen, die beim vorsichtigen Ansäuern mit verd. Essigsäure¹³⁾ eine je nach der Tierart verschieden große Menge eines Niederschlages abschieden. Nach Abzentrifugieren desselben wurden die Enzym-Lösungen 4 Tage in Hammel-Blinddärmen gegen fließendes destilliertes Wasser dialysiert. Auf diese Weise trennt man einen großen Teil der begleitenden (hoch- und nieder-molekularen) Stoffe ab, die wegen ihres Pufferungsvermögens die Genauigkeit der Meßmethode (Säure-Titration) bei den Affinitäts-Bestimmungen ungünstig beeinflussen können. Unter

⁸⁾ R. Willstätter, F. Memmen, Ztschr. physiol. Chem. **138**, 216 [1924], u. zw. S. 222 u. 223; R. Willstätter, E. Bamann und J. Waldschmidt-Graser, Ztschr. physiol. Chem. **173**, 155 [1928], u. zw. S. 157 u. 158.

⁹⁾ vergl. R. Willstätter, F. Memmen, Ztschr. physiol. Chem. **138**, 216 [1924], u. zw. S. 223.

¹⁰⁾ Über Spezifität der Enzyme, von R. Willstätter und R. Kuhn; II.: Saccharase- und Raffinase-Wirkung des Invertins, von R. Kuhn, Ztschr. physiol. Chem. **125**, 28 [1923].

¹¹⁾ R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz, Ztschr. physiol. Chem. **125**, 132 [1923], u. zw. S. 150.

¹²⁾ R. Willstätter, E. Bamann und J. Waldschmidt-Graser, Ztschr. physiol. Chem. **173**, 155 [1928], u. zw. S. 160.

¹³⁾ Nach R. Willstätter, E. Bamann und J. Waldschmidt-Graser, Ztschr. physiol. Chem. **173**, 155 [1928], u. zw. S. 160.

Toluol im Eisschrank aufbewahrt, zeigte keine der Lösungen nach 6 Monaten einen Rückgang ihrer Wirksamkeit. Dieselbe wurde nach der von R. Willstätter und F. Memmen¹⁴⁾ angegebenen Methode mit Buttersäure-methylester gemessen. Der Versuchs-Ansatz (100 ccm) enthält jedoch an Stelle von 0.8 g Ester 0.898 g (= 1 ccm); Glycerin und andere Zusätze, die sich für die Bestimmung der Pankreas-Lipase als notwendig erwiesen, fehlen.

Vergleicht man die Aktivität der verschiedenen Leber-Präparate auf Grund ihrer Wirksamkeit gegen Methylbutyrat unter den angegebenen Bedingungen, so findet man für 1 g Leberpulver beim:

Hund	Rind	Menschen	Schaf	Pferd	Kaninchen
18.8	18.8	24.5	49.5	78.8	274.0 Einheiten.

Daß es sich hier nicht um streng vergleichbare Enzym-Mengen handelt, wird in einer demnächst zu veröffentlichenden Untersuchung gezeigt werden. Die Abhängigkeit von der Wasserstoff-Ionen- und Substrat-Konzentration, die beim Leber-Enzym von Tierart zu Tierart Inkonzanz aufweist, ist nämlich in der Bestimmungsmethode unberücksichtigt.

Die Enzym-Lösungen enthielten nach der Dialyse 80–90% des Enzym-Gehaltes der Leberpulver, das Trockengewicht ging auf $\frac{1}{15}$ – $\frac{1}{20}$ zurück, so daß die Esterasen in etwa 15-fach reinerem Zustand angewandt wurden. Auffallend ist die verschiedene Farbenintensität der Lösungen. Während die Auszüge aus Kaninchen- und Schafleber nur einen Stich ins Gelbe zeigen, nimmt die Farbe beim Pferd, Rind, Menschen an Tiefe zu und erreicht beim Hund einen dunkelbraunroten Ton.

Als Substrate dienen *racem.* Mandelsäure-äthylester, (–)- und (+)-Mandelsäure-äthylester, dargestellt bzw. gereinigt nach den Angaben der I. Mitteilung.

Das spezif. Drehungsvermögen der (–)-Mandelsäure beträgt:

$[\alpha]_D^{18} = -1.95^0 \times 100/0.6200 \times 2 = -157.2^0$ (in Wasser), übereinstimmend mit dem von R. Willstätter und F. Memmen (-157^0) und dem von R. Willstätter, R. Kuhn und E. Bamann (-157.1^0) angegebenen Wert. Etwas niedriger war die spezif. Drehung des nach den Angaben von J. Lewkowitsch¹⁵⁾, E. Rimbach¹⁶⁾ und A. McKenzie¹⁷⁾ dargestellten Präparates von (+)-Mandelsäure: $[\alpha]_D^{18}$ betrug: $+2.24^0 \times 100/0.7200 \times 2 = +155.5^0$ (in Wasser). Weder 5-maliges vorsichtiges Umkrystallisieren des Cinchoninsalzes aus mehr als der erforderlichen Menge Wasser, noch wiederholte Umkrystallisation der Säure aus Benzol vermochte die Aktivität zu steigern. Den Säure-Werten entsprechend, ergeben sich auch für die Ester unterschiedliche Drehungen: $[\alpha]_D^{18}$ (–)-Ester = $-2.68^0 \times 100/0.6495 \times 2 = -206.3^0$ (in CS₂); $[\alpha]_D^{18}$ (+)-Ester = $+2.80^0 \times 100/0.6900 \times 2 = +202.8^0$ (in CS₂).

2. Einfluß der Substrat-Konzentration auf die Hydrolysen von Links- und Rechts-Mandelsäure-äthylester mit Leber-Esterase verschiedener Tiere.

Die Durchführung der Versuche geschah nach dem Vorbild der vorangehenden Abhandlung. Die Spaltung des Esters wurde titrimetrisch in

¹⁴⁾ Ztschr. physiol. Chem. **133**, 229 [1924], u. zw. S. 236.

¹⁵⁾ B. **16**, 1568 [1883], u. zw. S. 1573.

¹⁶⁾ B. **32**, 2385 [1899].

¹⁷⁾ Journ. chem. Soc. London **75**, 964 [1899], u. zw. S. 966.

puffer-freien Lösungen bei 25° verfolgt. Zu 100 ccm¹⁸⁾ Reaktionsgemisch, das 5 Tropfen einer 1-proz. alkoholischen Brom-thymolblau-Lösung enthielt, wurde zur Aufrechterhaltung einer konstanten h ($p_H = 7.0-7.1$) die notwendige Menge $n/_{100}$ -KOH tropfenweise zugegeben. Diese Methode ist beibehalten, da auch in sehr verdünnten Substrat-Lösungen die erforderliche Genauigkeit erreicht werden kann. Sie hat gegenüber der von H. H. Weber und R. Ammon¹⁹⁾ benutzten Warburg - Rona - Lasnitzkischen gasanalytischen Methode den Vorzug, in allen Substrat-Konzentrations-Gebieten anwendbar zu sein. Es dürfte bei den bisweilen sehr schwierigen Messungen weniger auf die Meßmethode, als vielmehr auf ihre geschickte Handhabung und die Berücksichtigung äußerer Umstände ankommen. So werden ungereinigte, stark eiweißhaltige Enzym-Präparate die Ergebnisse beider Methoden beeinflussen.

Der Reaktionsverlauf wurde mindestens 100 Min. beobachtet. In dieser Zeit mißt man nur Anfangs-Hydrolysen. In den konzentriertesten Lösungen (0.096-m.) betragen die Spaltungen 1% und darunter, in 0.012-molaren Lösungen 1-4% und in 10-mal verdünnteren 4-30%, durchschnittlich 15%. Der Umsatz ist der Zeit direkt proportional, der Reaktionsverlauf also nullmolekular. Tab. 1 enthält die Menge der bei verschiedenen Substrat-Konzentrationen in 25 Min. bei $p_H = 7$ und 25° durch Leber-Esterase verschiedener Herkunft gebildeten (-) - und (+) - Mandelsäuren. Beim Schaf, Hund, Menschen und Kaninchen ist die optimale Substrat-Konzentration für die (-) - Ester-Hydrolyse bei einer Molarität von 0.024 erreicht. Mit zunehmender Konzentration nimmt die Menge der gebildeten Säure wieder ab. Anders bei Pferd und Rind. Hier ist selbst in 0.096-m. Lösung das Maximum noch nicht erreicht. Bei der (+) - Ester-Spaltung genügt mit einer einzigen Ausnahme, dem Enzym der Schafleber, diese hohe Konzentration zur Erreichung des Maximalwertes noch nicht. Derselbe ist wegen der begrenzten Löslichkeit des Substrates nicht erreichbar.

Die Ergebnisse der Messungen in Tab. 1 sind in Fig. I-VI (S. 1545/6) graphisch dargestellt. Dabei wurde so verfahren, daß der Maximalwert der gebildeten Mandelsäure in jeder Versuchsreihe gleich 1 gesetzt und die bei niedrigeren bzw. höheren Ester-Konzentrationen gebildeten Mengen durch Verhältniszahlen ausgedrückt und diese als Funktion der reziproken Substrat-Konzentration ($-\log [S]$) aufgetragen wurden. Wenn man aus dem Abbiegen der Kurven in höheren Substrat-Konzentrationen auf dissoziations-freie Bindung des Enzyms schließen darf, so wird diese beim (-) - Ester nur im Fall der Leber-Esterase des Schafes, des Hundes, des Kaninchens und des Menschen, beim (+) - Ester ausschließlich im Fall der Schafleber-Esterase erreicht. Nur bei diesem Enzym ist es also möglich, nach dem üblichen Verfahren²⁰⁾ auf Grund der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten die Dissoziationskonstanten (K) der Esterase(-) - Mandelsäure-ester-

¹⁸⁾ In der I. Mitteilung steht (B. 61, 886 [1928], u. zw. S. 893) in dem Abschnitt „Affinitäts-Bestimmungen“ irrtümlich: Zu 50 ccm Reaktionsgemisch, es muß heißen: Zu 50 ccm (Versuche der Tabelle II) bzw. 100 ccm (Versuche der Tabelle III) Dementsprechend ist in Tabelle III an Stelle von 50 ccm 100 ccm zu setzen. Die Zahlen für die Enzym-Menge auf S. 889, sowie in Tabelle II u. III sind um das 5-fache zu erhöhen. In Figur 8 ist die Ordinaten-Teilung die gleiche wie in Figur 6 und 7, sie beginnt mit 2.

¹⁹⁾ Biochem. Ztschr. 204, 197 [1929], u. zw. S. 199.

²⁰⁾ L. Michaelis und M. L. Menten, Biochem. Ztschr. 49, 333 [1913].

Tabelle 1.

Einfluß der Substrat-Konzentration auf die enzymatische Spaltung
optisch aktiver Mandelsäure-äthylester.

(Die Zahlen bedeuten die durch die angegebene Enzymmenge in 100 ccm bei $p_H = 7$
und 25° in 25 Min. gebildeten mg Mandelsäure.)

Her- kunft des Enzyms	Relat. Menge	Molarität des (—)-Esters								
		0.096	0.048	0.024	0.012	0.008	0.004	0.001	0.0003	0.0001
Schaf	1.0	0.70	0.97	1.22	1.19	1.02	0.82	0.49	0.26	0.16
Kaninchen ..	4.0	1.11	1.27	1.41	1.30	1.16	0.87	0.46	0.22	0.10
Hund	2.0	1.34	1.65	1.98	1.95	1.88	1.57	1.03	0.42	0.24
Mensch	1.0	1.46	1.46	1.53	1.44	1.28	1.03	0.62	0.27	0.15
Rind	1.0	3.50	2.17	1.87	1.66	—	—	—	—	—
Pferd	2.0	1.17	0.74	0.57	0.48	—	—	—	—	—

Her- kunft des Enzyms	Relat. Menge	Molarität des (+)-Esters								
		0.096	0.048	0.024	0.012	0.008	0.004	0.001	0.0003	0.0001
Schaf	1.0	0.70	0.74	0.84	0.83	0.75	0.67	0.49	0.32	0.23
Kaninchen ..	4.0	0.81	0.66	0.58	0.47	0.39	0.27	0.13	0.07	0.05
Hund	2.0	1.34	1.14	1.07	0.94	0.87	0.81	0.65	0.50	0.33
Mensch	1.0	1.50	1.26	1.07	0.85	0.71	0.50	0.28	0.16	0.08
Rind	1.0	3.60	1.52	1.17	1.00	—	—	—	—	—
Pferd	2.0	1.65	0.91	0.74	0.65	—	—	—	—	—

und der Esterase-(+)-Mandelsäure-ester-Verbindung direkt aus den experimentell ermittelten Werten abzuleiten. Sie stimmen mit denen der Schweineleber-Esterase ($K_{(-)} = 0.00158$, $K_{(+)} = 0.00050$; I. Mitteilung) annähernd überein. Das trifft auch für das Verhältnis der Zerfallsgeschwindigkeiten (k) der Enzym-Substrat-Verbindungen zu; beim Schwein wurde das Verhältnis $k_{(-)}:k_{(+)} = 1.6:1$, beim Schaf = $1.44:1$ gefunden. In 0.001-molarer Lösung werden beide Antipoden vom Schweine- und vom Schafleber-Enzym gleich schnell gespalten, und die weitere Abnahme der Substrat-Konzentration hat hier wie dort eine Bevorzugung des (+)-Esters zur Folge. Einer größeren Zerfallsgeschwindigkeit des (—)-Reaktions-Zwischenproduktes steht also eine größere Affinität der Enzyme zum (+)-Ester gegenüber. Beim Kaninchen, Hund und Menschen kommt hingegen dem (—)-Ester die größere Affinität zu. Über das Verhältnis der Zerfallsgeschwindigkeiten geben die Messungen keinen Aufschluß. In 0.096-molarer Lösung erreicht die Reaktionsgeschwindigkeit der (+)-Ester-Spaltung die gehemmte Reaktionsgeschwindigkeit der (—)-Ester-Hydrolyse im Fall des Kaninchens beinahe, im Fall des Hundes ganz und beim Menschen übertrifft sie dieselbe und erreicht annähernd die maximale Geschwindigkeit derselben. Auf Grund der Kurven der Abbildungen V und VI, die in den höchsten Konzentrationen erst im Ansteigen begriffen sind, ist den Esterasen der Rinds- und Pferdeleber eine bedeutend geringere Affinität zu den geprüften Substraten zuzuschreiben.

Die (scheinbaren) Dissoziationskonstanten mehrerer Esterase-Ester-Verbindungen sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2.

Dissoziationskonstanten einiger Leber-esterase-Ester-Verbindungen.

	(-)-Mandelsäure-äthylester			(+) -Mandelsäure-äthylester		
	$-\log k(-)$	$k(-)$	$1/k(-)$	$-\log k(+)$	$k(+)$	$1/k(+)$
Kaninchen	2.68	0.00209	478.7	—	—	—
Mensch	2.78	0.00166	602.6	—	—	—
Hund.....	2.96	0.00110	909.0	—	—	—
Schaf	2.78	0.00166	602.6	3.15	0.00071	1408.4

Ausgeprägter als in der ersten Mitteilung ist an dem hier geprüften Enzym-Material eine in höheren Substrat-Konzentrationen auftretende Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit. Diese Erscheinung ist nicht neu. Schon Michaelis und Menten²¹⁾ haben bei hohen Rohrzucker-Konzentrationen eine Abnahme der Inversionsgeschwindigkeit beobachtet, die später von H. von Euler und K. Myrbäck²²⁾ bis zu einer Zucker-Konzentration von 70% verfolgt wurde. R. Kuhn²³⁾ hat bei der Raffinose-Spaltung durch Invertin, R. Willstätter, R. Kuhn und H. Sobotka²⁴⁾ haben bei der Hydrolyse einiger β -Glucoside durch Emulsin in den konzentriertesten Lösungen Abweichungen gefunden, die durchwegs zu geringe Dissoziations-
reste ergaben.

Die Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit, die bei den einzelnen Esterasen ungleich groß ist, tritt bei den Aktivitäts- p_s -Kurven des (-)-Esters durch das Abfallen der Kurven, bei denen des (+)-Esters nur durch eine Verzögerung des Anstiegs in Erscheinung.

Die Auswertung dieser bisher beschriebenen Anomalien hat noch nicht zu einer allgemein befriedigenden Erklärung geführt.

Aktivitäts- p_s -Kurven.

Auf den Ordinaten der Abbildungen (Fig. 1—6, S. 1545/6) sind mg Mandelsäure pro zweckmäßig gewählte Zeiteinheit, auf den Abscissen die negativen Logarithmen der Substrat-Konzentration aufgetragen.

o — o — o = (-)-Mandelsäure-äthylester
+ — + — + = (+)-Mandelsäure-äthylester

3. Abhängigkeit der asymmetrischen Ester-Hydrolyse von der Racemat-Konzentration.

In den Untersuchungen über die optische Spezifität der Esterasen ist es unbekannt geblieben, daß für das Auswählungsvermögen der Esterasen der Konzentration des Racemates eine wichtige Rolle zukommt. R. Willstätter und seine Mitarbeiter haben in der umfassenden Untersuchungs-

²¹⁾ L. Michaelis und M. L. Menten, Biochem. Ztschr. **49**, 333 [1913].

²²⁾ Ztschr. physiol. Chem. **124**, 159 [1922/23].

²³⁾ Über Spezifität der Enzyme, von R. Willstätter und R. Kuhn, II.: Saccharase- und Raffinase-Wirkung des Invertins, von R. Kuhn, Ztschr. physiol. Chem. **125**, 28 [1923].

²⁴⁾ Ztschr. physiol. Chem. **129**, 33 [1923].

Fig. 3. Leber-Esterase des Hundes.

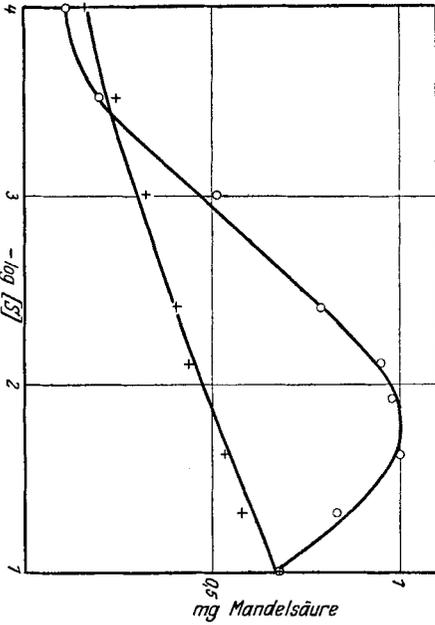


Fig. 1. Leber-Esterase des Schafes.

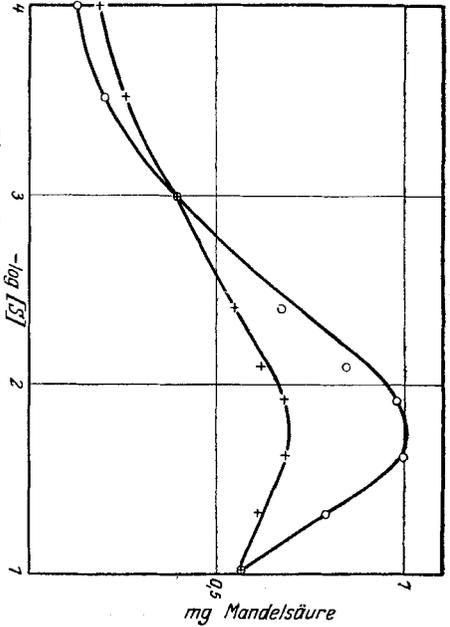


Fig. 4. Leber-Esterase des Menschen.

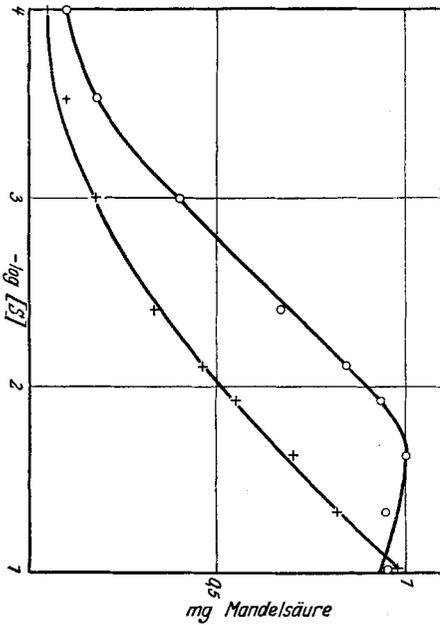
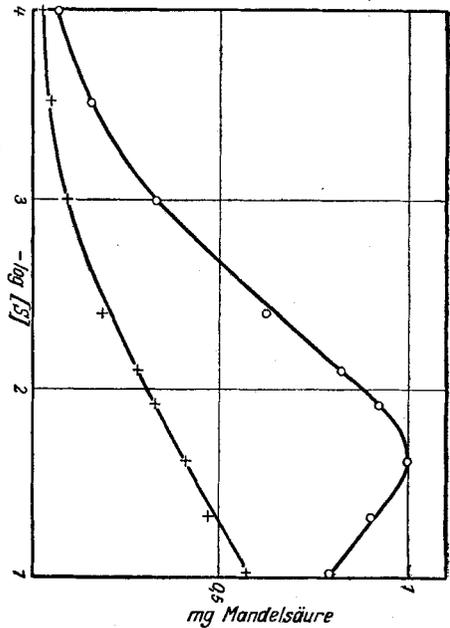


Fig. 2. Leber-Esterase des Kaninchens.



reihe „Über Pankreas-Enzyme“ in der VIII., IX. und XIV. Abhandlung²⁵⁾ je ein Kapitel der Konfigurations-Spezifität gewidmet, mit dem Ziele, die

²⁵⁾ Ztschr. physiol. Chem. 138, 216 [1924], Ztschr. physiol. Chem. 140, 203 [1924], Ztschr. physiol. Chem. 146, 151 [1925].

Bedeutung dieser Erscheinung an ausgedehnterem Enzym- und Substrat-Material zu prüfen. Die Untersuchung von R. Willstätter, E. Bamann und J. Waldschmidt-Graser „Über die Konfigurations-Spezifität der

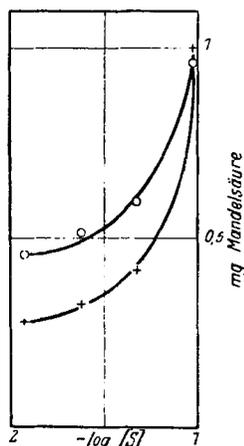


Fig. 5. Leber-Esterase des Rindes.

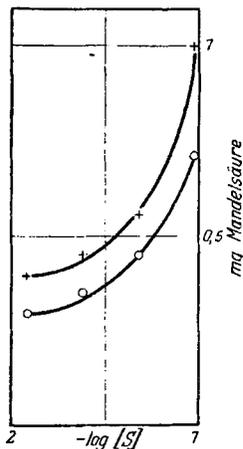


Fig. 6. Leber-Esterase des Pferdes.

Esterasen in verschiedenen Reinheitsgraden“, in der die Einwirkung von Leber-, Pankreas- und Magen-Lipase in rohen und reinsten Zuständen auf Mandelsäure-ester und Phenyl-chlor-essigsäure-ester geprüft wurde, „hat zu dem Ergebnis geführt, daß sich in keinem Falle bei der Steigerung des enzymatischen Reinheitsgrades der Sinn des stereochemischen Auswählens ändert“. Und die I. Mitteilung dieser Reihe zeigte, daß „die optische Aktivierung des racemischen Mandelsäure-esters von der Wasserstoff-Ionen-Konzentration“ ($p_{\text{H}} = 6.0 - 8.0$), „sowie von der Menge des angewandten Enzyms (1:3) unabhängig ist“ und führte zu der Auffassung, „daß für das spezif. Drehungsvermögen der entstehenden Mandelsäure nur der erzielte Spaltungsgrad bestimmend ist“. Es gelingt aber durch Änderung der Substrat-Konzentration die spezif. Drehung der Größe und dem Sinne nach zu variieren. Dieses Ergebnis läßt sich verstehen, da die Konfigurations-Spezifität der Esterasen als eine komplexe Erscheinung auf das Zusammenwirken der Enzym-Affinitäten zu den Substraten und der Zerfallsgeschwindigkeiten der Reaktions-Zwischenprodukte zurückgeführt wird.

Die Versuche der Tabelle 3 sind bei 25° ausgeführt und enthalten in 50 ccm Reaktionsgemisch 2.0 bzw. 0.25 bzw. 0.125 g *racem.* Mandelsäure-äthylester und entsprechend 4.0 bzw. 2.0 bzw. 1.0 g Phosphat-Puffer $p_{\text{H}} = 7$; die konzentriertesten Lösungen enthalten noch ungelösten Ester in flüssiger Form; durch gleichmäßiges Schütteln ist eine ständige Sättigung der Lösung und eine feine Verteilung des Esters gewährleistet.

Die Analyse der Versuchslösung geschah gemäß den Angaben der I. Mitteilung. Das Reaktionsgemisch wurde schwach soda-alkalisch gemacht und ausgeäthert. Nach Entfernung des unverseiften Esters wurde der mit Phosphorsäure stark angesäuerten und mit Ammoniumsulfat gesättigten Lösung die Mandelsäure durch Ausäthern ent-

zogen. Die nach dem Verdampfen der gewaschenen und getrockneten Äther-Auszüge hinterbleibende Säure wurde in Wasser zu 10 ccm gelöst und nach Bestimmung des Drehungswinkels im 2-dm-Rohr (bei Zimmer-Temperatur) mit n_{10} -Lauge titriert.

Tabelle 3.

Hydrolyse von *racem.* Mandelsäure-äthylester mit Leber-Esterase verschiedener Herkunft.

(Die Angaben beziehen sich auf 50 ccm Analysenprobe; Vers. 1, 4, 8 u. 11 sind mit 4 g, Vers. 2, 3, 5, 6, 9 u. 10 mit 2 g, Vers. 7 mit 1 g Phosphat $P_H = 7.0$ gepuffert.)

Vers.	Herkunft des Enzyms	Relat. Menge	Reakt.- Dauer (Std.)	Spal- tung (Proz.)	Ester- Menge (g)	Dreh.-Winkel der Mandelsäure (10 ccm, 1 = 2)	$[\alpha]_D$ der Mandelsäure
1	Schaf ..	30.00	10	10.3	2.0	+2.60	+74.2
2a	„ ..	1.66	3	5.7	0.25	+0.17	+69.9
b	„ ..	1.66	7 ³ / ₄	14.9	0.25	+0.41	+65.3
c	„ ..	1.66	11 ³ / ₄	22.0	0.25	+0.58	+62.5
d	„ ..	1.66	14 ³ / ₄	28.0	0.25	+0.70	+59.3
e	„ ..	1.66	26	51.6	0.25	+1.14	+52.6
f	„ ..	1.66	31	66.6	0.25	+1.00	+35.7
g	„ ..	1.66	40	85.5	0.25	+0.40	+11.1
3a	„ ..	1.66	7	12.5	0.25	+0.36	+68.0
b	„ ..	1.66	24	49.2	0.25	+1.08	+52.1
c	„ ..	1.66	36	82.9	0.25	+0.54	+15.4
4a	Mensch .	16.00	6	12.2	2.0	+2.25	+50.0
b	„ .	16.00	12	20.0	2.0	+3.25	+48.0
5a	„ .	1.67	10	22.4	0.25	—	—
b	„ .	1.67	22	44.5	0.25	+0.18	+9.6
c	„ .	1.67	28	57.2	0.25	+0.21	+8.9
6a	„ .	4.55	3	20.6	0.25	+0.05	+5.8
b	„ .	4.55	7	42.3	0.25	+0.16	+9.0
7a	„ .	4.16	2 ¹ / ₄	24.8	0.125	—0.18	—34.3
b	„ .	4.16	5 ¹ / ₄	51.5	0.125	—0.32	—29.4
8a	Kaninchen	120.0	4	8.5	2.0	+1.55	+53.3
b	„	120.0	12	15.4	2.0	+2.50	+48.2
9a	„	3.33	10	5.9	0.25	—0.13	—52.0
b	„	3.33	30	16.4	0.25	—0.32	—46.4
c	„	3.33	53	23.7	0.25	—0.41	—41.0
10a	„	16.65	2	6.9	0.25	—0.15	—52.0
b	„	16.65	4	12.9	0.25	—0.25	—46.2
c	„	16.65	9	25.7	0.25	—0.46	—42.4
d	„	16.65	16	43.7	0.25	—0.60	—32.5
e	„	16.65	28	63.1	0.25	—0.72	—27.1
f	„	16.65	33	72.1	0.25	—0.75	—24.6
11	Hund...	30.0	15	4.3	2.0	+0.39	+53.8

Die Versuchsreihen 4, 5, 6 und 7 (Menschenleber-Esterase) zeigen die Abhängigkeit der spezif. Drehung von der Ester-Konzentration. Bei etwa gleichen Spaltungsgraden beträgt in ester-gesättigter Lösung (Versuch 4) $[\alpha]_D$ der Mandelsäure +48°, bei niedrigerer Konzentration (Versuch 5 und 6) +6° und in noch verdünnter Lösung (Versuch 7) —34°; bei Kaninchenleber-Esterase steht dem Wert von $[\alpha]_D = +53°$ (Versuch 8, Konzentration

wie Versuch 4) der Wert $[\alpha]_D = -52^\circ$ (Versuch 9, Konzentration wie Versuche 5 und 6) gegenüber. Hier ändert sich der Sinn der Drehung schon bei geringerer Konzentrations-Abnahme. Diese Erscheinung findet ihre Erklärung in dem Zusammenwirken der Affinitäten der Esterasen zu den beiden optisch aktiven Formen des Racemates und der Zerfallsgeschwindigkeiten der (—)- und (+)-Substrat-Enzym-Verbindungen. Aus dem Kurvenverlauf der Abbildungen II und IV ist zu schließen, daß bei niederen Esterkonzentrationen dem Verhältnis der Affinitäten entsprechend ein Mehrfaches an (—)-Ester-Enzym-Verbindung gebildet wird, das — selbst bei geringerer Zerfallsgeschwindigkeit — einen (—)-Aus Schlag im Racemat

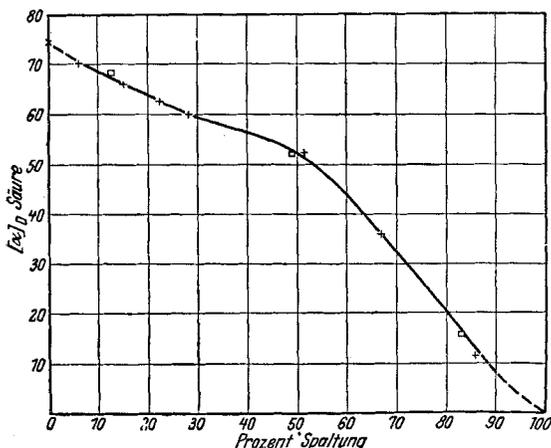


Fig. 7.

Abhängigkeit der spezifischen Drehung der Mandelsäure vom Spaltungsgrad bei der Hydrolyse von *racem.* Mandelsäure-äthylester mit

Leber-Esterase des Schafes.

× Versuch 1 der Tabelle 3.

+ Versuch 2 der Tabelle 3.

□ Versuch 3 der Tabelle 3.

Der lineare Abfall der $[\alpha]_D$ -Kurve zu Beginn der Spaltung erklärt sich daraus, daß das Verhältnis der Umsatzgeschwindigkeiten $v_{(+)} : v_{(-)}$ in Lösungen, die mehr als 0.02 Mol Ester im Liter enthalten, anfangs abnimmt²⁶⁾ (Fig. I).

Die vorliegende Untersuchung wurde durch ein Forschungs-Stipendium der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft gefördert; ich danke aufrichtig für diese Unterstützung.

²⁶⁾ Für den bei Schweineleber-Esterase beobachteten Anstieg der $[\alpha]_D$ -Kurve (Fig. 5 der I. Mitteilung) bei kleinen Spaltungsgraden trifft die in Fußnote 12 gegebene Begründung nicht zu. Für die Erklärung des Anstiegs (Leber-Esterase vom Schwein) bzw. des Abfalls (Leber-Esterase vom Schaf) der $[\alpha]_D$ -Kurven in den ersten Reaktionsstadien kann, worauf mich Hr. Prof. R. Kuhn freundlichst aufmerksam machte, die Berücksichtigung der Bindungs-Geschwindigkeiten des Enzyms an die Substrate von Bedeutung werden.