

Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft.

1930, Nr. 11.

— Abteilung B (Abhandlungen) —

10. Dezember.

452. Eugen Bamann und Paul Laeverenz:

Die Konfigurations-Spezifität der Leber-Esterase in ihrer Abhängigkeit von Änderungen am Enzym-Komplex. (Fünfte¹⁾ Mitteilung „Über asymmetrische Ester-Hydrolyse durch Enzyme“ in der von R. Willstätter, R. Kuhn und E. Bamann begonnenen Untersuchungsreihe.)

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayerisch. Akademie d. Wissenschaften in München.]
(Eingegangen am 15. Oktober 1930.)

Es ist noch nicht entschieden, ob die stereochemische Spezifität der Esterasen eine Eigenart der Enzyme ist, oder ob sie durch Begleitstoffe bedingt wird, mit denen sie in ihren physiologischen Komplexen mehr oder weniger eng assoziiert vorkommen. Diese Frage wurde zuerst von R. Willstätter, E. Bamann und J. Waldschmidt-Graser²⁾ aufgeworfen, und zwar zu der Zeit, als im Laboratorium von R. Willstätter insbesondere durch die Untersuchungen „Zur Kenntnis des Invertins“ die Erfahrung gewonnen worden war, daß sich die Enzyme je nach ihrer Darstellung und Reinigung mit den Begleitstoffen zu Aggregaten verschiedenster Zusammensetzung zu vereinigen vermögen, und daß dadurch eine Reihe von Merkmalen der Enzyme, wie ihre Stabilität, ihr Adsorptionsverhalten und sogar die Abhängigkeit des Wirkungsvermögens von der Wasserstoff-Ionen-Konzentration stark beeinflußt werden kann³⁾. Die wechselnde Gesellschaft mit Begleitstoffen könnte auch für die Konfigurations-Spezifität der lipatischen Enzyme verantwortlich sein; in diesem Falle erschiene die große Mannigfaltigkeit dieser Erscheinung, die sich dadurch ergibt, daß die Lipasen nicht nur der verschiedenen Organe eines Tieres, sondern auch ein und desselben Organes verschiedener Tiere bei der Spaltung eines racemischen Substrates quantitativ ganz verschieden auswählen, gut verständlich.

Durch weitgehende Reinigung mittels Adsorptionsverfahrens, die im Falle der Lipasen und Esterasen gerade so, wie bei der Saccharase zu einer Veränderung und Abtrennung der accessorischen Begleitstoffe führt⁴⁾, ist es jedoch bisher nicht gelungen, das optische Auswählen zu beeinflussen. Dasselbe Ergebnis zeitigte die Reinigung der Menschenleber-Esterase, die wir nach dem Vorbild der Reinigung der Schweineleber-Esterase durch H. Kraut und H. Rubenbauer nunmehr ausgeführt haben.

¹⁾ Fortsetz. d. III. Mittel.; B. **63**, 394 [1930].

²⁾ Ztschr. physiol. Chem. **173**, 155 [1927/28].

³⁾ R. Willstätter, J. Graser u. R. Kuhn, Ztschr. physiol. Chem. **123**, 1 [1922], u. zw. Teil D, Abschn. 2 u. 4; R. Willstätter u. K. Schneider, Ztschr. physiol. Chem. **142**, 257 [1924/25], u. zw. S. 264; R. Willstätter, K. Schneider u. E. Wenzel, Ztschr. physiol. Chem. **151**, 1 [1925/26].

⁴⁾ R. Willstätter u. E. Bamann, Ztschr. physiol. Chem. **173**, 17 [1927/28]; H. Kraut u. H. Rubenbauer, Ztschr. physiol. Chem. **173**, 103 [1927/28].

Es ist aber auf einem anderen Wege möglich, die stereochemische Spezifität einiger Esterasen zu beeinflussen. Wir haben in der III. Mitteilung⁵⁾ dieser Untersuchungsreihe berichtet, daß der Zusatz von optisch aktiven Fremdstoffen, beispielsweise Strychnin, die optische Spezifität der Leber-Esterasen des Menschen und Kaninchens völlig verändert. Diese Zusatzstoffe vereinigen sich mit dem Enzym zu einem neuen Komplex mit veränderten Eigenschaften. Dieser Komplex scheint nach den Befunden der vorangehenden⁶⁾ Arbeit dissoziabel zu sein, so daß durch längere Dialyse wieder eine Trennung des Fremdkörpers vom Enzym erfolgt.

Einen weiteren Fortschritt haben wir nun dadurch erzielt, daß wir auf die stereochemische Spezifität auch ohne Zusatz von Fremdstoffen, allein durch geeignete Vorbehandlung der Enzym-Präparate, Einfluß nehmen können. Vergleicht man einen ammoniakalischen Auszug aus einem Trockenpräparat (dargestellt durch Behandlung der Frischleber mit Aceton und Äther) von Menschen- oder Kaninchen-Leber, der durch Ausfällen von Eiweißstoffen und darauffolgende Dialyse gereinigt ist, mit einem gleich vorbehandelten Auszug aus demselben Trockenpräparat, das einige Tage im Trockenschrank bei 60–65° gestanden hatte, oder mit einem ebenfalls vorgereinigten Auszug aus Frischleber, die, zerkleinert und mit Toluol vermischt, etwa eine Woche dem proteolytischen Abbau bei schwach saurer Reaktion ausgesetzt worden war, hinsichtlich ihres optischen Auswählens bei der Spaltung von *rac.* Mandelsäure-ester, so stößt man auf erhebliche Unterschiede. Während das Enzym aus dem unvorbehandelten Trockenpräparat die beiden Komponenten des Racemates etwa gleich rasch spaltet, bevorzugt die aus dem gedörrten Präparat gewonnene Esterase unter den gleichen Reaktionsbedingungen den (+)-Mandelsäure-ester ($[\alpha]_D$ der Mandelsäure = +12°) und die aus dem autolytierten Hackbrei dargestellte den (-)-Ester ($[\alpha]_D$ der Mandelsäure = -15°). Einige Beispiele, welche diese Effekte in Richtung und Größe ersehen lassen, führen wir in Tabelle 1 an.

Tabelle 1.

Abhängigkeit des optischen Auswählens von der Vorbehandlung der Enzyme. (Die Analysen-Proben von 100 ccm enthalten in den Versuchen mit Menschenleber-Esterase 0.50 g *rac.* Mandelsäure-äthylester und 4.0 g Phosphat pH = 7, in den Versuchen mit Kaninchenleber-Esterase 1.0 g Ester und 4.0 g Puffer.)

Vers.	Herkunft und Behandlung des Enzyms	Spaltung (Proz.)	$[\alpha]_D$ d. Mandelsäure
1	Menschenleber 7: Ammoniakal. Auszug aus unvorbehandelt. Trockenpräp. nach Essigsäure-Fällung und Dialyse	14.5	— 2.4°
2	Menschenleber 7: Ammoniakal. Auszug aus gedörrt. Trockenpräp. nach Essigsäure-Fällung und Dialyse	14.0	+ 11.8°
3	Menschenleber 7: Ammoniakal. Auszug aus autolytiert. Hackbrei nach Essigsäure-Fällung und Dialyse	15.0	— 14.8°
4	Kaninchenleber 3 ⁷⁾ : Ammoniakal. Auszug aus unvorbehandelt. Trockenpräp. nach Essigsäure-Fällung und Dialyse	7.1	— 6.0°
5	Menschenleber 3: Ammoniakal. Auszug aus gedörrt. Trockenpräp. nach Essigsäure-Fällung und Dialyse	7.3	+ 10.1°

⁵⁾ B. 63, 394 [1930].⁶⁾ Ztschr. physiol. Chem. (im Druck).⁷⁾ Trockenpräp. vom 6. V. 1930.

Diese Befunde sind wohl so zu verstehen, daß der Enzym-Komplex auf Grund der Vorbehandlung eine Veränderung in seiner Konstitution erlitten hat. Solche Veränderung könnte, ähnlich wie nach dem Zusatz von Fremdstoffen, durch Anlagerung eines spezifischen Stoffes, eines in der Enzym-Lösung entstehenden Abbauproduktes von Begleitstoffen oder eines Zersetzungsproduktes des Enzyms, an den physiologischen Komplex erfolgen; sie könnte aber auch durch eine Zerlegung des im lebenden Organ gebildeten, festgefügteten Komplexes zustande kommen. Die erste Möglichkeit halten wir für die wahrscheinlichere. Denn es wird — falls es überhaupt möglich ist — schwieriger zu erreichen sein, das im Organismus bestehende Gebilde, den physiologischen Komplex im engsten Sinne, unter Erhaltung der chemisch wirksamen Gruppe zu zerlegen. Dieser Komplex bedingt die feineren Unterschiede hinsichtlich der Herkunft des Enzyms, die wir nur durch reaktionskinetische Messungen auffinden, und die sich in der Verschiedenheit der Dissoziationskonstanten und Zerfallsgeschwindigkeiten der Enzym-Substrat-Verbindungen äußern, die also auch für die stereochemische Spezifität verantwortlich sind. In den Enzym-Lösungen und bereits an den Entstehungs-Orten vermögen diese Komplexe mit einzelnen, den verschiedenen chemischen Körperklassen angehörenden Begleitstoffen Aggregate zu bilden. Diesen, mit dem Enzym assoziierten Stoffen, die bestimmend sind für dessen Kolloidverhalten, sowie für gewisse physikalische Einflüsse und die durch Reinigungs- und Adsorptions-Verfahren in wechselndem Maße abgetrennt werden können, kommt erfahrungsgemäß im allgemeinen keine spezifische Bedeutung zu. Denn der Tatsache von der Unabhängigkeit der Aktivitäts- p_s -Kurven vom Reinheitsgrad des Invertins⁸⁾ steht das unveränderte stereochemische Auswählen ungereinigter und gereinigter Esterasen gegenüber. Andererseits ist mit der Änderung der Konfigurations-Spezifität, die durch eine Änderung der chemischen Konstitution des Enzym-Komplexes infolge Anlagerung spezifischer, für die chemisch wirksame Gruppe nicht unbemerkt bleibender Stoffe bedingt ist, die Affinitäts-Verschiebung gewisser Saccharasen durch Zusatz von Kochsäften⁹⁾ zu vergleichen.

Die Parallelen, die der Vergleich der Beobachtungen am Invertin und an den Esterasen ergibt, machen es aussichtsreich, die Auffassung, die R. Kuhn¹⁰⁾ bezüglich der Identität der Saccharasen verschiedener Herkunft ausgesprochen hat, auch auf die Verhältnisse bei den Esterasen anzuwenden. Da jedoch die reaktionskinetischen Messungen bei diesen Enzymen noch nicht das klare Bild wie bei den Saccharasen geben haben, wahrscheinlich auch nicht geben werden, so muß es vorerst noch als Arbeits-Hypothese gelten, daß die Unterschiede hinsichtlich des optischen Auswählens nicht durch eine Verschiedenheit der reaktionsfähigen chemischen Gruppe der Esterasen zu erklären sind, sondern daß sie in der im Organismus vorgenommenen, wechselnden Verknüpfung mit spezifischen, die katalytisch wirksame Gruppe tragenden und beeinflussenden Körpern ihre Ursache haben.

⁸⁾ R. Willstätter, J. Graser u. R. Kuhn, *Ztschr. physiol. Chem.* **123**, 1 [1922], u. zw. S. 50 u. 51; R. Kuhn, *Ztschr. physiol. Chem.* **125**, 28 [1922/23], Teil II, Abschn. 3.

⁹⁾ Über Spezifität der Enzyme, von R. Willstätter u. R. Kuhn; II. Saccharase- und Raffinase-Wirkung des Invertins von R. Kuhn, *Ztschr. physiol. Chem.* **125**, 28 [1922/23], Teil II, Abschn. 6.

¹⁰⁾ *Ztschr. physiol. Chem.* **125**, 28 [1922/23], u. zw. S. 54.

Beschreibung der Versuche.

I. Vergleich des optischen Auswählens ungereinigter und gereinigter Leber-Esterase des Menschen.

Zum Vergleich des optischen Auswählens der Menschenleber-Esterase in verschiedenen Reinheitsgraden stand uns das Enzym-Material der vorangehenden Abhandlung¹¹⁾ dieser Reihe zur Verfügung. Es waren ammoniakalische Auszüge aus den mittels Acetons dargestellten Trockenpräparaten zweier Lebern des Menschen, mäßig gereinigt durch Abtrennen der durch Essigsäure ausfällbaren Eiweißstoffe, sowie durch darauffolgende Dialyse gegen fließendes destilliertes Wasser, ferner die durch Adsorptionsverfahren daraus gewonnenen reinsten, heute zugänglichen Präparate. Die Reinheitsgrade entsprachen bei den Trockenpulvern dem Lipase-Wert¹²⁾ = 0.2 und bei den daraus dargestellten und hinsichtlich ihres optischen Auswählens zu vergleichenden wenig- und hoch-gereinigten Lösungen den Lipase-Werten = etwa 3 bzw. ≈ 25 .

Die weitgehende Abtrennung der zufälligen Begleitsubstanzen mittels des schonenden Adsorptionsverfahrens wirkt sich auf das optische Auswählen der Menschenleber-Esterase in den untersuchten Fällen nicht in erkennbarer Weise aus.

Tabelle 2.

Vergleich des optischen Auswählens der Menschenleber-Esterase in verschiedenen Reinheitsgraden.

(Die Analysen-Proben von 100 ccm enthält. 0.50 g *rac.* Mandelsäure-äthylester; 4.0 g Phosphat $pH = 7$; 6 Lipase-Einh.¹²⁾; Reakt.-Dauer 5 Stdn.; $t = 25^{\circ}$.)

Vers.	Beschreibung und Reinheitsgrad (Lipase-Wert) des Enzyms	Spaltung (Proz.)	Dreh.-Winkel d. Mandelsäure (10ccm; $l = 2$ dm)	$[\alpha]_D$ d. Mandelsäure
1	Menschenleber 6: Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. und Dialyse; 3.0	11.0	$\pm 0.00^{\circ}$	$\pm 0.0^{\circ}$
2	Menschenleber 6: Elution ≈ 22 ...	11.0	-0.06°	-6.5°
3	Menschenleber 7: Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. und Dialyse; 2.9	13.6	-0.03°	-2.6°
4	Menschenleber 7: Elution ≈ 25 ...	13.7	$\pm 0.00^{\circ}$	$\pm 0.0^{\circ}$

II. Unabhängigkeit der stereochemischen Spezifität von der Enzym-Menge.

Bisher ist noch keine Untersuchung näher darauf eingegangen, ob die optische Auswahl der Esterasen von der Enzym-Menge abhängt. Das könnte sehr wohl der Fall sein, unter anderem und vor allem dann, wenn den üblichen Begleitstoffen des Enzyms ein Einfluß auf sein Verhalten gegenüber den Antipoden des Racemats zukäme. Wir haben daher im Anschluß an die

¹¹⁾ Ztschr. physiol. Chem., im Druck.

¹²⁾ Die Enzym-Menge (Lipase-Einheiten der Tabellen) ist ermittelt unter den in der II. Mitteil. (B. 62, 1538 [1929], u. zw. S. 1541) angegebenen Bedingungen. Der Reinheitsgrad ist bestimmt durch den Lipase-Wert, das ist die Zahl der in 1 cg der Trockensubstanz enthaltenen Lipase-Einheiten.

Versuche des vorstehenden Abschnittes diese Frage an einem größeren Enzym-Material und in sehr weiten Spannen geprüft. Die Versuchs-Bedingungen und -Ergebnisse sind in Tabelle 3 (S. 2944/45) enthalten.

Die Versuche mit Esterasen aus Menschen-, Schaf- und Schweine-Leber zeigen übereinstimmend, daß die stereochemische Spezifität unabhängig ist von der Enzym-Menge, selbst wenn man dieselbe in einem weiten Bereich, bei Menschenleber-Esterase beispielsweise 1:50, bei Schweineleber-Esterase¹³⁾ 1:60, variiert.

Vor kurzem haben P. Rona, R. Ammon und M. Werner¹⁴⁾ in einer Untersuchung über die stereochemische Spezifität der Taka-Esterase auf eine Abhängigkeit der optischen Spezifität dieses Enzyms „von der Substrat- und Ferment-Menge“ aufmerksam gemacht. „Wenn auch keine Änderung des Drehungs-Sinnes der Mandelsäure gezeigt werden konnte, so ist doch deutlich eine Verminderung des $[\alpha]_D$ durch Vergrößerung der Ferment- und Verkleinerung der Substrat-Menge erreicht worden.“ Diese Darstellung, sowie der Stab der Tabelle III: Verhältnis von Ferment- zu Substrat-Menge erwecken den Eindruck, als ob bei der von uns aufgefundenen und in der II. Mitteilung¹⁵⁾ dieser Untersuchungsreihe beschriebenen Erscheinung der „Abhängigkeit der Konfigurations-Spezifität von der Substrat-Konzentration“ dem Verhältnis von Enzym- zu Substrat-Menge eine Bedeutung zukäme. Ein solcher Zusammenhang stünde nicht im Einklang mit den heute geltenden, von R. Kuhn¹⁶⁾ entwickelten Vorstellungen über die Wirkung und die Spezifität von Enzymen. Für die von den genannten Forschern gezogene Folgerung schien uns das eigene Material (3 Versuche) zu wenig beweiskräftig, und in den aus früheren Untersuchungen herangezogenen Versuchen sahen wir keine Stütze dafür. Aus diesem Grunde unternahmen wir eine Nachprüfung, welcher die Befunde von Rona auch nicht standgehalten haben. Wir finden nämlich das optische Auswählen der Taka-Esterase genau wie das der Leber-Esterasen unabhängig von der Enzym-Menge und — wie nach den Aktivitäts- p_s -Kurven vorauszusehen war — auch unabhängig von der Substrat-Konzentration.

Die Ausführung der Versuche in Tabelle 4 wurde uns ermöglicht durch die freundliche Unterstützung der chemischen Fabrik Parke, Davis & Co., London W 1, der wir für die Übersendung einer Probe frisch dargestellter „undiluted Taka-Diastase Nr. 56020“ unseren besten Dank ausdrücken. Die Versuche 1a und 2 dieser Tabelle, in denen sich die Enzym-Mengen wie 6:1 verhalten, zeigen bei gleichen Spaltungsgraden die gleichen Werte für $[\alpha]_D$ der Mandelsäure. Und aus den Beispielen 3 und 4 darf man auf eine Unabhängigkeit der Auswahl von der Substrat-Konzentration innerhalb

¹³⁾ In der I. Mitteil. (B. 61, 886 [1928]) wurde bei Schweineleber-Esterase ein Anstieg der $[\alpha]_D$ -Kurve bei kleinen Spaltungsgraden gefunden (Fig. 5, S. 890). Die in Anm. 12 dieser Mitteilung, sowie in Anm. 26 der II. Mitteilung gegebenen Erklärungen für den Anstieg treffen nicht zu. Der Anstieg ist nämlich vorgetäuscht durch Anwendung eines nicht völlig säure-freien Esters. Die Nachprüfung mit demselben Enzym-Material, sowie die Prüfung mit dem Enzym anderer Schweinelebern ergaben von den ersten Spaltungsgraden an einen geringen, allmählich zunehmenden Abfall der Kurve, wie es die theoretischen Überlegungen verlangen.

¹⁴⁾ Biochem. Ztschr. 217, 42 [1929/30].

¹⁵⁾ B. 62, 1538 [1929].

¹⁶⁾ Ztschr. physiol. Chem. 125, 1 u. 28 [1922/23]; Naturwiss. 1928, 732; C. Oppenheimer, R. Kuhn, Die Fermente, 5. Aufl. I, Leipzig 1925, S. 193 ff.

Ta-

Unabhängigkeit der Konfigurations-Spezifität der
(Die Analysen-Proben von 100 ccm enthält. 0.50 g *rac.* Mandelsäure-

Vers.	Enzym
1a	Menschenleber 4: Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. u. Dialyse
b	Menschenleber 4: Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. u. Dialyse
2a	Menschenleber 7: Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. u. Dialyse
b	Menschenleber 7: Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. u. Dialyse
3a	Schafleber 1: Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. u. Dialyse
b	Schafleber 1: Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. u. Dialyse
4a	Schweineleber 2: Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. u. Dialyse
b	Schweineleber 2: Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. u. Dialyse

der Grenzen 0.10—0.60 g Ester: 50 ccm schließen. Das Maximum der Umsatz-Geschwindigkeit ist bei einer Konzentration von 0.1 g Ester: 50 ccm noch nicht erreicht, sie nimmt bei Erhöhung auf 0.25 g bzw. 0.60 g Ester zu. Umgekehrt bewirkt die Vermehrung der Puffer-Menge (Versuch 5) eine Verminderung der Spaltung-Geschwindigkeit.

Tabelle 4.

Unabhängigkeit des optischen Auswählens der Taka-Esterase von der Enzym-Menge, sowie von der Substrat-Konzentration.

(Die Analysen-Proben von 50 ccm enthält. als Substrat *rac.* Mandelsäure-äthylester.)

Vers.	Enzym-Menge (g)	Substrat-Konzentrat. (g : ccm)	Phosphat-Puffer PH = 7 (g)	Reakt.-Dauer (Stdn.)	Spaltung (Proz.)	Dreh.-Winkel d. Mandelsäure (10 ccm; l = 2 dm)	$[\alpha]_D$ d. Mandelsäure
1a	0.30	0.25 : 50	2.0	4	10.0	+0.46°	+109.50
b	0.30	0.25 : 50	2.0	8	21.9	+0.92°	+ 99.7°
c	0.30	0.25 : 50	2.0	14	37.2	+1.42°	+ 90.5°
2	0.05	0.25 : 50	2.0	24	10.7	+0.49°	+108.5°'
3	0.30	0.60 : 50	2.0	16	19.5	+2.04°	+103.5°
4	0.30	0.10 : 50	2.0	4	18.7	+0.32°	+101.3°'
5	0.30	0.10 : 50	6.0	8	27.1	+0.42°'	+ 91.8°'

Außerdem stand uns ein jahrelang gealtertes, etwa 5-mal schwächer wirksames Taka-Präparat zur Verfügung¹⁷⁾. Es war eines der üblichen Handels-Präparate derselben Firma, die zur Behandlung der Stärke-Dyspepsie angewendet werden. Damit konnten wir in mehreren Versuchen die Unabhängigkeit der optischen Spezifität von der Enzym-Menge (1 : 20), sowie von der Substrat-Konzentration bestätigen; wir fanden größere Enzym-Mengen (4 g) (wohl wegen der dieses Gewicht ausmachenden Beimengungen), sowie in Übereinstimmung mit den obigen Resultaten größere Puffer-Mengen

¹⁷⁾ Wir verdanken dasselbe Fr. Dr. M. Rohdewald.

belle 3.

Leber-Esterase von der Enzym-Menge.

äthylester; 4.0 g Phosphat, $p_H = 7$; $t = 25^{\circ}$.)

Lipase-Einh. ¹⁸⁾ = ccm Lösung	Reakt.-Dauer (Std.n.)	Spaltung (Proz.)	Dreh.-Winkel d. Mandelsäure (10 ccm; l = 2 dm)	$[\alpha]_D$ d. Mandelsäure
50 = 88.25 ccm	$\frac{1}{3}$	8.2	+0.03°	+ 4.3°
1 = 1.77 „	$16^{\frac{3}{4}}$	5.4	+0.02°	+ 4.4°
30 = 78.6 „	2	23.4	+0.06°	+ 3.0°
3 = 7.8 „	$10^{\frac{3}{4}}$	11.9	$\pm 0.00^{\circ}$	$\pm 0.0^{\circ}$
20 = 86.2 „	$\frac{2}{3}$	9.6	+0.56°	+69.2°
0.5 = 2.16 „	$26^{\frac{3}{4}}$	10.2	+0.59°	+68.5°
60 = 81.0 „	$\frac{1}{3}$	5.9	+0.43°	+86.3°
1 = 1.35 „	20	5.9	+0.43°	+86.3°

hemmend und die Umsatz-Geschwindigkeit bei Erhöhung der Substrat-Konzentration von 0.10 g Ester auf 0.25 g: 50 ccm ansteigend¹⁸⁾.

III. Das optische Auswählen bei verschiedener Vorbehandlung der Enzyme.

Um einen weiteren Einblick in das Wesen der Konfigurations-Spezifität zu bekommen, haben wir geprüft, ob es möglich ist, mit Hilfe weniger schonender Verfahren den Enzym-Komplex in spezifischer Weise zu verändern. Eine Konstitutions-Änderung des Komplexes sollte sich auf die optische Spezifität auswirken. In der Tat beobachteten wir nach gewissen Verfahren der Einwirkung auf das Enzym in einer Reihe von Versuchen, und zwar bei den Esterasen aus Menschen- und Kaninchen-Leber, eine erhebliche Beeinflussung des optischen Auswählens. Vergleicht man Auszüge aus Trockenpräparaten, die 2–3 Tage bei einer Temperatur von 60–65° im Trockenschrank aufbewahrt und dabei in ihrer Wirksamkeit auf etwa $\frac{1}{3}$ zurückgegangen waren, mit solchen aus den unvorbehandelten Trockenpulvern hinsichtlich ihres optischen Auswählens, so fällt eine starke Bevorzugung des (+)-Mandelsäure-esters auf; die Werte für $[\alpha]_D$ der Mandelsäure sind daher positiv. Einen etwa ebenso großen Ausschlag der $[\alpha]_D$ -Werte nach der negativen Seite beobachteten wir hingegen, wenn wir die Auszüge aus zerkleinerten Frischlebern, die, mit Calciumcarbonat und Toluol vermischt, etwa 6 Tage bei Zimmer-Temperatur dem proteolytischen Abbau überlassen waren, herstellten. In einzelnen Fällen gelang es auch schon, allein durch Einstellung alkalischer Reaktion ($p_H =$ etwa 8), die vor dem Versuch wieder aufgehoben wurde, das optische Auswählen des Enzyms zu beeinflussen; die Werte der spezifischen Drehung der Mandelsäure waren hier negativ. Eine Übersicht über diese Ergebnisse gibt die Tabelle 5. Bei den meisten Beispielen enthielt die Analysen-Probe von 100 ccm 0.50 g Ester und 4 g Phosphat-Puffer. Unter diesen Bedingungen erfolgt nämlich die Spaltung

¹⁸⁾ Die Beschreibung der Taka-Esterase ergänzen wir durch den Hinweis, daß sich weder das frische, noch das gealterte Enzym-Präparat durch Strychnin, Chinin und Chinidin (100 mg: 50 ccm) hinsichtlich des optischen Auswählens und der Umsatz-Geschwindigkeit beeinflussen ließ.

Ta-

Abhängigkeit des optischen Auswählens

(Die Analysen-Proben von 100 ccm enthalt. in Vers. 1 mit 3, 6 mit 11, 15 mit 19: 0.50 g
0.20 g Ester und 2.0 g Puffer, in Vers. 20 mit 23:

Vers.	Herkunft und Behandlung des Enzyms
1	Menschenleber 6: Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. u. Dialyse, gealtert
2	„ 6: Auszug Vers. 1, 2 Tage bei alkal. Reaktion.....
3	„ 6: Auszug Vers. 2, 2 Tage bei saurer Reaktion.....
4	„ 6: Auszug Vers. 1
5	„ 6: Auszug Vers. 2
6	„ 5: Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. u. Dialyse.....
7	„ 5: Ammoniakal. Auszug aus gedör. Trockenpräp. nach Essig- säure-Fäll. und Dialyse
8	„ 7: Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. u. Dialyse.....
9	„ 7: Ammoniakal. Auszug aus autolyt. Hackbrei nach Dialyse
10	„ 7: Auszug Vers. 9
11	„ 7: Ammoniakal. Auszug aus gedör. Trockenpräparat nach Essigsäure-Fäll. u. Dialyse
12	„ 7: Auszug Vers. 9
13	„ 7: Auszug Vers. 9
14	„ 7: Auszug Vers. 11
15	„ 7: Ammoniakal., dialysiert. Auszug aus Trockenpräp. d. autoly- siert. Hackbreis
16	„ 8 ¹⁹⁾ : Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. u. Dialyse
17	„ 8: Wäßrig. Auszug aus frischem Hackbrei
18	„ 8: Ammoniakal. Auszug aus autolyt. Hackbrei nach Dialyse
19	„ 8: Ammoniakal. Auszug aus gedör. Trockenpräp. nach Essig- säure-Fäll. u. Dialyse
20 a	Kaninchenleber 3: Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. u. Dialyse
b	„ 3: Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. u. Dialyse
21 a	„ 3: Ammoniakal. Auszug aus gedör. Trockenpräp. nach Essig- säure-Fäll. u. Dialyse
b	„ 3: Ammoniakal. Auszug aus gedör. Trockenpräp. nach Essig- säure-Fäll. u. Dialyse
22	„ 4 ²⁰⁾ : Ammoniakal. Auszug nach Essigsäure-Fäll. u. Dialyse
23	„ 4: Ammoniakal. Auszug aus autolyt. Hackbrei nach Dialyse

der beiden Antipoden des Racemates durch die üblichen Auszüge aus Menschenleber mit nahezu gleicher Geschwindigkeit, so daß die Werte für $[\alpha]_D$ der Mandelsäure in der Nähe von $\pm 0^\circ$ liegen. Ändert sich nun auf Grund der eben beschriebenen Verfahren das optische Auswählen, so nimmt das $[\alpha]_D$ positive oder negative Werte an. So betragen in den Versuchen 8, 11 und 10 die Werte für die spezifische Drehung der Mandelsäure bei etwa gleichen Spaltungsgraden im Falle des üblichen Auszuges aus unvorbehandeltem Trockenpräparat: -2.6° , im Falle des Auszuges aus gedörtem Trockenpräparat: $+12.3^\circ$ und im Falle des Auszuges aus autolytisertem Hackbrei: -14.5° . In den Beispielen 4 und 5, sowie 12 mit 14 der Tabelle 5 wurde eine

¹⁹⁾ Trockenpräparat vom 8. VII. 1930.²⁰⁾ Trockenpräparat vom 11. VII. 1930.

belle 5.

von der Vorbehandlung des Enzyms.

rac. Mandelsäure-äthylester und 4.0 g Phosphat, pH = 7, in Vers. 4 und 5, 12 mit 14: 1.0 g Ester und 4.0 g Puffer; t = 25°.)

Lipase-Einh. 13)	Reakt.- Dauer (Stdn.)	Spaltung (Proz.)	Dreh.-Winkel ²¹⁾ d. Mandelsäure (10 ccm; l = 2 dm)	[α] _D der Mandelsäure
6.0	5	11.0	$\pm 0.00^0$	$\pm 0.0^0$
6.0	5	11.0	-0.11^0	-11.8^0
6.0	5	10.4	-0.07^0	-8.0^0
4.5	5	20.7	-0.24^0	-34.3^0
6.0	5	28.3	-0.43^0	-45.2^0
4.3	5	10.4	-0.04^0	-4.5^0
6.0	5	11.9	$+0.21^0$	$+21.0^0$
6.0	5	13.6	-0.03^0	-2.6^0
6.0	5	8.7	-0.12^0	-16.3^0
12.0	5	15.5	-0.19^0	-14.5^0
6.0	5	11.5	$+0.12^0$	$+12.3^0$
5.0	5	16.2	-0.26^0	-47.4^0
10.0	5	32.0	-0.45^0	-41.7^0
5.0	5	30.3	-0.24^0	-23.4^0
6.0	5	8.1	$\pm 0.00^0$	$\pm 0.0^0$
4.0	5	10.4	$\pm 0.00^0$	$\pm 0.0^0$
4.9	5	7.7	-0.02^0	-3.0^0
10.0	5	17.7	-0.10^0	-6.7^0
6.0	5	13.8	$+0.10^0$	$+8.6^0$
32.9	2 $\frac{1}{4}$	5.0	-0.02^0	-2.4^0
32.9	4 $\frac{1}{4}$	9.9	-0.10^0	-6.0^0
7.5	15 $\frac{1}{4}$	7.7	$+0.12^0$	$+9.2^0$
7.5	23 $\frac{3}{4}$	11.8	$+0.17^0$	$+8.5^0$
50.0	5	18.9	-0.25^0	-7.9^0
50.0	5	18.4	-0.47^0	-15.2^0

niedrigere Substrat-Konzentration gewählt (siehe Kopf der Tabelle); in diesem Konzentrations-Gebiet bewirkt die Vorbehandlung des Enzyms je nach seiner Art eine Erhöhung oder eine Erniedrigung des negativen Wertes der spezif. Drehung der Mandelsäure.

Prüft man die Versuche der Tabelle 5 hinsichtlich des Verhältnisses des Wirkungsvermögens der Esterasen gegenüber Buttersäure-ester und Mandelsäure-ester, indem man die angewandten Lipase-Einheiten in Beziehung zur erreichten Spaltung des Mandelsäure-esters setzt, so verschiebt

²¹⁾ Die Drehungswinkel stellen das Mittel aus etwa 6 Einzel-ablesungen dar, die vom Mittel nie mehr als $\pm 0.02^0$ differierten.

sich im allgemeinen dieses Verhältnis bei vorbehandelten Enzymen zu Ungunsten der Mandelsäure-ester-Spaltung. Ob diese Quotienten-Verschiebung, was sehr nahe läge, mit der Änderung des optischen Auswählens in Zusammenhang zu bringen ist, können wir noch nicht entscheiden. Es muß zuerst der Einwand entkräftet werden, daß die Esterasen durch die Vorbehandlung instabiler werden und dann in der Versuchszeit von 5 Stdn. einer rascheren Inaktivierung unterliegen als dieselben Enzyme ohne Vorbehandlung.

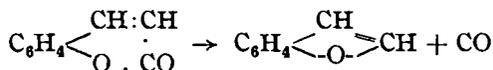
Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sprechen wir für die Förderung unserer Untersuchungen aufrichtigen Dank aus.

453. N. A. Orlow und W. W. Tistschenko: Über neue Bildungsweisen des Cumarons und des Diphenylenoxyds.

[Aus d. Laborat. für Kohlen-Chemie d. Kohlen-Forschungsinstituts Leningrad.]
(Eingegangen am 30. September 1930.)

Im Laufe unserer Arbeiten über die Bildungsreaktionen einzelner Bestandteile des aromatischen Steinkohlenteers konnten wir die Beobachtungen von Kraemer und Spilker¹⁾ über die außerordentliche thermische Stabilität des Cumarons in vollem Maße bestätigen. In einer früheren Mitteilung stellte der eine von uns in Gemeinschaft mit Belopolsky²⁾ fest, daß bei pyrogener Spaltung des Hexahydro-diphenylenoxyds ein (polymeres) Methyl-cumaron entsteht. Die Reaktion ist jedoch von manchen Nebenprozessen begleitet, so daß die Ausbeute an Methyl-cumaron nur gering ist.

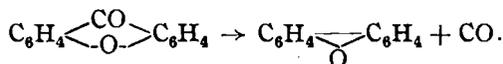
Untenstehend soll eine neue pyrogene Bildungsweise des Cumarons beschrieben werden, die in glatter Weise vom Cumarin zum Cumaron führt. Die Zugänglichkeit des Ausgangsmaterials, gute Ausbeuten und der hohe Reinheitsgrad des erhaltenen Cumarons lassen die neue Reaktion:



als eine bequeme Darstellungsweise betrachten.

Auch in bezug auf die Bildungsweise des Cumarons im Kokerei-Teer kann die neue Reaktion von einer gewissen Bedeutung sein, da die Cumarin-Abkömmlinge im Pflanzenreiche sehr verbreitet sind und in einer mehr oder minder veränderten Form auch als Bestandteile der Kohlensubstanz vorkommen können.

Das Cumarin kann als α -Benzopyron betrachtet werden. Es lag deshalb der Gedanke nahe, auch andere Pyron-Derivate den gleichen Versuchsbedingungen auszusetzen. Wenn die Reaktionsrichtung für Pyron-Derivate allgemein ist, müssen dabei Furan-Abkömmlinge entstehen. Als ein zugängliches Objekt wählten wir zu weiteren Versuchen Xanthon, d. h. Dibenzo- γ -pyron. Der Versuch ergab als einzige Produkte seiner thermischen Zersetzung nur Diphenylenoxyd (d. h. Dibenzofuran) und Kohlenoxyd:



¹⁾ B. 23, 81 [1890].

²⁾ B. 62, 1752 [1929].