

Eine weitere Präzisierung der Versuchs-Bedingungen ist mit Hilfe der beschriebenen Anordnung nicht mehr möglich. Will man die Genauigkeit der Bestimmung um eine oder mehrere Größenordnungen steigern, so sind grundsätzlich andere Versuchs-Anordnungen, wie z. B. die auf Richards, Untersuchungen zurückgehende Ausgleichmethode²⁸⁾, heranzuziehen.

Zum Schluß weisen wir darauf hin, daß auch in den zahlreichen anderen Fällen im Gebiete der Polysaccharide und ähnlicher Substanzen, in denen nur kleine Depressionen ermittelt werden, bei Anwendung der Unterkühlungs-Methode zunächst die alten Erfahrungen für Präzisionsmessungen berücksichtigt werden sollten, bevor eine grundsätzliche Ablehnung der klassischen Methoden für die Ermittlung der Molekulargewichte bei der in Frage stehenden Körperklasse erfolgt.

131. Eugen Bamann und Paul Laeverenz: Über den Einfluß der Spaltprodukte auf das optische Auswählen einer Esterase. (VI.¹⁾ Mitteil. „Über asymmetrische Ester-Hydrolyse durch Enzyme“ in der von R. Willstätter, R. Kuhn und E. Bamann begonnenen Untersuchungsreihe.)

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissenschaften in München.]
(Eingegangen am 30. Januar 1931.)

Als wir vor einigen Jahren begannen, die stereochemische Spezifität der ester-spaltenden Enzyme zu untersuchen, sahen wir eine Hauptaufgabe darin, die grundlegenden Arbeiten früherer Forscher in reaktionskinetischen Beziehungen zu ergänzen. Auf diesem Wege ist es auch sehr bald gelungen, einen sehr merkwürdigen Befund der Erklärung zugänglich zu machen, die Feststellung nämlich, daß durch Leber-Esterase des Schweines bei der Spaltung des racemischen Mandelsäure-äthylesters die rechtsdrehende Komponente, bei Versuchen dagegen, in denen die optisch aktiven Ester einzeln als Substrate angewandt wurden, die linksdrehende Komponente rascher verseift wird. Die Erklärung dieses scheinbaren Widerspruchs zwischen dem Verhalten des Racemates und dem der optischen Komponenten ergab sich aus dem Verhältnis der Affinitäten des Enzyms zu den optischen Antipoden und dem der Zerfalls-Geschwindigkeiten der Reaktions-Zwischenprodukte: „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 Hydrolysen-Geschwindigkeiten nur 1,6 : 1 zugunsten der Esterase-Linksester-Verbindung beträgt.“²⁾ Die Berücksichtigung der beiden genannten Einflüsse auf der Grundlage des Massenwirkungs-Gesetzes führte im Falle der Esterase aus Schweine-Leber zu einer annähernden Übereinstimmung der errechneten und experimentell gefundenen Werte, wohl deshalb, weil sich die Werte für

²⁸⁾ Th. W. Richards, Ztschr. physikal. Chem. **44**, 563 (1903); I. Ebert u. J. Lange, Ztschr. physikal. Chem. (A) **149**, 389 [1930].

¹⁾ Fortsetzung der II. und III. Mitteil. dieser Reihe: E. Bamann, B. **62**, 1538 [1929]; E. Bamann u. P. Laeverenz, B. **63**, 394 [1930].

²⁾ R. Willstätter, R. Kuhn u. E. Bamann, I. Mitteil., B. **61**, 886 [1928].

dieses hochaffine Enzym aus Messungen in Gebieten sehr niedriger Substrat-Konzentration ergaben, in denen sich Störungen noch nicht in erheblichem Maße geltend machen.

In einer anschließenden Untersuchung³⁾ entdeckten wir bei der Leber-Esterase des Menschen und derjenigen des Kaninchens die Abhängigkeit der Konfigurations-Spezifität von der Konzentration des racemischen Substrates. Diese Enzyme bevorzugen in konzentrierten Racemat-Lösungen den (+)-Mandelsäure-ester, in weniger konzentrierten spalten sie die Antipoden gleich rasch, so daß die Hydrolyse unspezifisch verläuft, und in sehr verdünnten Lösungen zerlegen sie den (-)-Mandelsäure-ester rascher. Die Ursache dieses auffallenden Phänomens sahen wir in dem Zusammenwirken der Affinitäten der Esterase zu den beiden optisch aktiven Formen des Racemates und der Zerfalls-Geschwindigkeiten der (-)- und (+)-Substrat-Enzym-Verbindungen.

P. Rona, H. Fischgold und R. Ammon⁴⁾ haben sich nun unlängst der Mühe unterzogen, unseren am Äthylester der Mandelsäure gemachten Befund auch für den Methylester zu bestätigen. Außerdem nehmen sie zu dem Erklärungsversuche Stellung, wobei sie zu einer Ablehnung desselben kommen: „Es liegt gewiß recht nahe, daß bei dieser Erscheinung die Affinitäts- und Hydrolysen-Konstanten der Ferment-Substrat-Verbindungen eine gewisse Rolle spielen können. Uns erschien aber die Erklärung Bamanns unzureichend; wir glauben, daß seine Ergebnisse, sowie auch frühere, von uns erhobene Befunde, nicht aus den Hydrolyse- und Affinitäts-Konstanten herzu- leiten sind und uns dazu zwingen, noch einmal die Anwendungs-Möglichkeiten der Grundlagen zu überprüfen, die uns zu einer Herleitung dieser Konstanten berechtigen.“ Das Ergebnis dieser Überprüfung wird aber von den Autoren am Schlusse ihrer Arbeit folgendermaßen gekennzeichnet: „Es ist nicht gelungen, den Mechanismus, der der Inversion zugrunde liegt, aufzufinden. Jedenfalls ist es nicht möglich, sie aus dem Zusammenwirken der Affinitäts- und Hydrolyse-Konstanten der Reaktions-Zwischenprodukte zu erklären.“

Es liegt gewiß im Interesse der Forschung, daß die Untersuchung so verwickelter Probleme durch Meinungsäußerungen von verschiedenen Seiten gefördert wird. Indessen scheinen uns die vorgebrachten Argumente noch nicht dafür zu genügen, unsere Ansicht über die Ursache der Abhängigkeit der Konfigurations-Spezifität von der Substrat-Konzentration unwahrscheinlich zu machen. Denn 1) treffen die Voraussetzungen, die Rona und seine Mitarbeiter zu einer Ablehnung der Erklärung führen, nicht zu, und 2) sprechen weitere experimentelle Befunde, von denen im Anschluß an diese Erörterung die Rede sein wird, zugunsten oder zumindest nicht gegen die geäußerte Auffassung.

Das Tatsachen-Material, aus dem wir unsere Schlüsse gezogen haben, ist folgendes: Wenn man die Umsatz-Geschwindigkeit der optisch aktiven Ester bei verschiedenen Konzentrationen prüft und die Resultate graphisch darstellt, so erhält man das in Fig. 1 dargestellte Kurvenbild. Daraus ist zu entnehmen, daß — im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der hochaffinen Schweineleber-Esterase — das Maximum der Reaktions-Geschwindigkeit beim (-)-Ester erst in hohen Substrat-Konzentrationen und beim (+)-Ester

³⁾ II. Mitteil., B. 62, 1538 [1929].

⁴⁾ Biochem. Ztschr. 228, 77 [1930].

überhaupt nicht erreicht wird. Während die Kurve dieses Esters in den höchsten Konzentrationen noch im Ansteigen begriffen ist, fällt die des (-)-Esters ab, so daß sich beide Kurven überschneiden. Aus diesen Tatsachen, insbesondere aus dem Umstand, daß die Umsatz-Geschwindigkeit der (-)-Ester-Verbindung nach dem Erreichen eines Maximums nicht konstant bleibt, sondern ständig abnimmt, haben wir unsere Aussage für die Verhältnisse im Mischversuch, der Racemat-Spaltung, hergeleitet: „Aus dem Kurvenverlauf . . . ist zu schließen, daß bei niederen Ester-Konzentrationen, dem Verhältnis der Affinitäten entsprechend, ein Mehrfaches an (-)-Ester-Enzym-Verbindung gebildet wird, das — selbst bei geringerer Zerfalls-Geschwindigkeit — einen (-)-Ausschlag im Racemat bewirkt. Umgekehrt

ist in den konzentriertesten Lösungen gegenüber der überwiegenden, aber träge zerfallenden (-)-Ester-Enzym-Verbindung die größere Umsatz-Geschwindigkeit der (+)-Ester-Enzym-Verbindung der ausschlaggebende Faktor für das optische Auswählen.“ In den an dieser und an anderen Stellen der II. Abhandlung gegebenen Erklärungen wird nicht von einer Zerfalls-Konstante der Enzym-Substrat-Verbindungen gesprochen. Der Begriff „Konstante“ ist mit Absicht vermieden, da er in Widerspruch stünde mit der Beobachtung, daß in höheren Konzentrations-Gebieten eine Hemmung der Reaktions-Geschwindigkeit auftritt, die „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 tritt“. In hohen Konzentrations-Gebieten weichen die Kurven von der Form einer Dissoziations-Restkurve ab, und die einfachen und übersichtlichen Verhältnisse, die sich im Idealfalle aus dem Massenwirkungs-Gesetze herleiten, gehen verloren; diese Verhältnisse läßt die Erklärung unserer Erscheinung nicht unbeachtet. Sie baut sich vielmehr darauf auf, indem sie als ausschlaggebend annimmt, daß mit dem Ansteigen der Substrat-Konzentration der Komplex Enzym-(-)-Ester zunehmend langsamer zerfällt, wodurch der (+)-Ester gegenüber seinem Antipoden hinsichtlich der Hydrolyse in Vorsprung kommt.

• Während der Einwand Ronas, auf einem Mißverstehen unserer Ausdrucksweise fußend, kein Argument gegen unsere Auffassung darstellt, hatten wir bislang selbst ein wichtiges Bedenken gegen unseren Erklärungsversuch

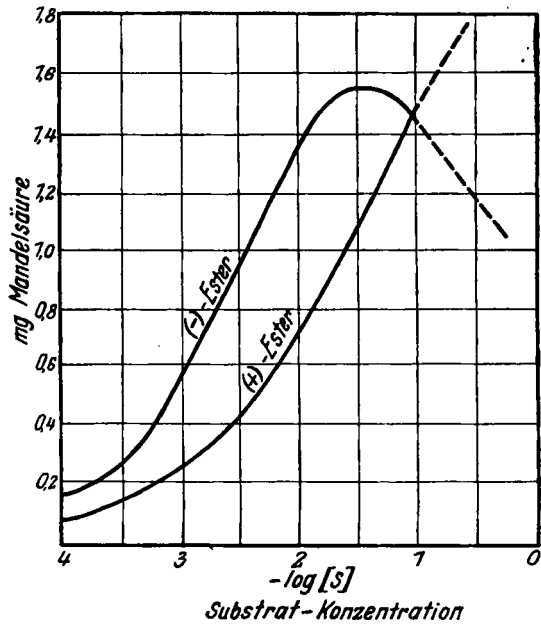


Fig. 1. Spaltung der optisch aktiven Mandelsäure-äthylester durch Leber-Esterase des Menschen. (Nach den Versuchen der Tab. I in der II. Mitteilung.)

ins Feld zu führen: Wenn man nämlich bei der Hydrolyse von *racem.* Mandelsäure-ester durch Leber-Esterase des Menschen (auch des Kaninchens) die Bedingungen so wählt, daß in den ersten Spaltungsgraden (etwa bis 10 oder 20% Spaltung) der (+)-Ester um ein ganz Geringes rascher verseift wird, das $[\alpha]_D$ der isolierten Mandelsäure zum Beispiel nur $+2^\circ$ oder $+3^\circ$ beträgt, so müßte nach einer Spaltung von 30 oder 40%, wo das Substrat nur mehr teilweise vorhanden ist und eine Konzentration erreicht hat, bei der das Enzym im Vergleichsversuche bereits den (-)-Ester bevorzugt, sich das Auswählen nach einem kurzen Übergang geändert haben, d. h. es müßte der (-)-Ester rascher verseift werden, was sich in einem negativen $[\alpha]_D$ der Mandelsäure äußern würde. Das wäre speziell bei unserer Auffassung über den Reaktions-Mechanismus zu erwarten, da ja mit Abnahme der Substrat-Konzentration die Zerfalls-Geschwindigkeit des (-)-Ester-Enzym-Komplexes ständig zunimmt und der normalen, ungehemmten zustrebt. Die gestrichelte Kurve (I) der Abbildung 2 veranschaulicht diese Verhältnisse.

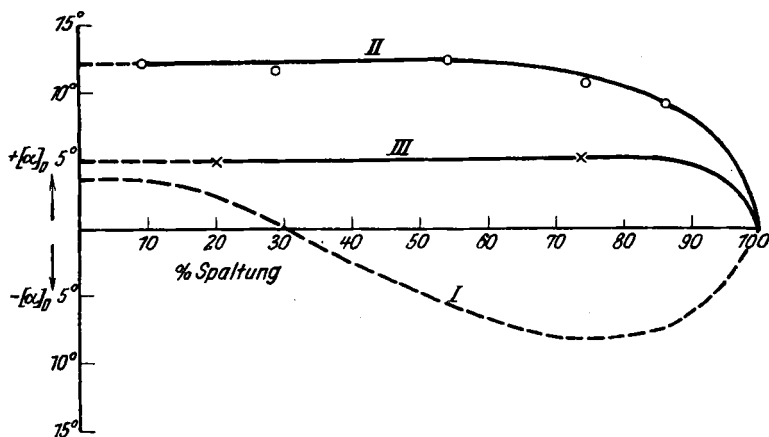


Fig. 2. Abhängigkeit der spezifischen Drehung der Mandelsäure vom Spaltungsgrad⁵⁾ bei der Hydrolyse von *racem.* Mandelsäure-äthylester mit Leber-Esterase des Menschen (Erklärung der Kurven I, II und III im Text).

Wir haben uns aber in einer Anzahl von sorgfältig durchgeführten Versuchsreihen davon überzeugen müssen, daß während des Spaltungsversuches nie ein Wechsel in der Bevorzugung der optischen Komponenten stattfindet (Tab. I). Ein Spaltungsansatz mit Leber-Esterase des Menschen, der bei 10% Spaltung zu einer Mandelsäure mit der spezif. Drehung von etwa $+11^\circ$ führt, liefert auch bei Spaltungsgraden von 70 und 80% eine Säure mit einem $[\alpha]_D$ von etwa $+9^\circ$. Erst dann fällt die Kurve ab (Kurve II der Abbild. 2). Und sogar eine zu Beginn der Spaltung praktisch auf der Abszisse verlaufende $[\alpha]_D$ -Kurve (Kurve III der Abbild. 2) biegt nicht in das Gebiet des $-[\alpha]_D$ um.

⁵⁾ Es liegt keine Veranlassung vor, das optische Auswählen der Esterasen zu Beginn der Spaltung weniger selektiv anzunehmen; deshalb entspricht die Darstellung der Kurven bei niederen Spaltungsgraden nach Rona, Fischgold und Ammon nicht den Tatsachen.

Tabelle 1.

Hydrolyse von *racem.* Mandelsäure-äthylester mit Leber-Esterase des Menschen und des Kaninchens.(Die Versuche 1 mit 3 sind mit 4.0 g, die Versuche 4 mit 2.0 g Phosphat p_H = 7 gepuffert; t = 25°).

Vers.	Herkunft des Enzyms	Lipase-Einh.	Substrat-Konzentrat. g : ccm	Reaktionsdauer (Std.)	Spaltung (Proz.)	Dreh.-Winkel d. Mandelsäure. (10 ccm, l = 2 dm)	[α] _D d. Mandelsäure
1 a)	Menschen-Leber 6..	20	0.5 : 100	$\frac{2}{3}$	9.8	+0.10°	+12.1°
1 b)	20	0.5 : 100	2	29.4	+0.29°	+11.7°
1 c)	20	0.5 : 100	4	54.5	+0.58°	+12.6°
1 d)	20	0.5 : 100	6	75.0	+0.66°	+10.4°
1 e)	20	0.5 : 100	8	86.5	+0.65°	+ 8.9°
2 a)	20	0.4 : 100	1 $\frac{1}{2}$	27.0	+0.07°	+ 3.8°
2 b)	20	0.4 : 100	5	75.1	+0.40°	+ 7.9°
3 a)	Menschen-Leber 7..	7	0.5 : 100	4	20.2	+0.08°	+ 4.7°
3 b)	7	0.5 : 100	20	74.0	+0.33°	+ 5.3°
4 a)	Kaninchen-Leber (Mischpräparat) ..	60	0.7 : 50	3 $\frac{3}{4}$	19.6	+0.46°	+19.8°
4 b)	60	0.7 : 50	5	26.1	+0.56°	+18.2°
4 c)	60	0.7 : 50	17	72.5	+0.15°	+ 1.8°
4 d)	60	0.7 : 50	20 $\frac{1}{4}$	81.4	±0.00°	± 0.0°

Diese Befunde, sowie die reaktionskinetische Seite unserer etwas späteren Beobachtung, daß nämlich das durch höhere Substrat-Konzentrationen veranlaßte positive Auswählen der beiden genannten Esterasen durch einen geringen Zusatz von optisch aktiven Fremdstoffen, wie Strychnin, im Falle der Kaninchenleber-Esterase hinsichtlich der Selektivität erhöht wird, bei der Esterase aus Menschenleber hingegen in eine Bevorzugung des (-)-Esters umschlägt⁶⁾, haben uns bestimmt, zur Klärung dieser Fragen reaktionskinetische Messungen, vor allem mit den optisch aktiven Estern zu wiederholen bzw. neu auszuführen⁷⁾. Mitten in dieser Arbeit sind wir von einer „Vorläufigen Mitteilung“ von P. Rona, R. Ammon und H. Fischgold in der Klinischen Wochenschrift vom 10. dieses Monats überrascht worden, aus der hervorgeht, daß diese Autoren den Einfluß von Strychnin auf den Reaktions-Mechanismus ebenfalls untersucht und bereits aufgedeckt haben.

Während die genannten Forscher sich mit dem Ausbau unserer Beobachtungen über den Strychnin-Einfluß beschäftigt haben, hat gleichzeitig das Eindringen in das erwähnte reaktionskinetische Problem uns zu einem neuen und entscheidenden Befund geführt, der nicht nur für die aufgeworfene Frage, sondern darüber hinaus von Belang ist.

⁶⁾ III. Mittel., B. 63, 394 [1930].

⁷⁾ Siehe die Problem-Stellung und Bemerkung in der IV. Mittel., Ztschr. physiol. Chem. 193, 201 [1930], u. zw. S. 202.

Der Einfluß des Spaltproduktes Alkohol auf das optische Auswählen der Esterasen.

Für die Untersuchung der Frage, warum sich das optische Auswählen unter den geeigneten Bedingungen (erörtert im Zusammenhang mit Abbild. 2) im Laufe der Racemat-Verseifung nicht ändert, erschien es uns nötig, zu wissen, ob die entstehenden Spaltstücke einen Einfluß auf den Reaktionsablauf ausüben. Rona, Fischgold und Ammon hatten einen „Einfluß der Spaltprodukte auf die optisch auswählende Hydrolyse“ für „nicht wahrscheinlich“ gehalten und aus Versuchen, in denen *rac.* bzw. (–)-Mandelsäure zugesetzt worden war, zu früh geschlossen, „daß die Zusätze von Spaltprodukten die optische Orientierung der Menschenleber-Esterase nicht beeinflussen.“ Die Spaltprodukte eines Esters bestehen aber aus Säure und Alkohol. Obwohl aus 0.5 g Mandelsäure-äthylester maximal nur 0.128 g Äthylalkohol entstehen können und sich diese Menge, die kaum 3 Tropfen entspricht, unter unseren Versuchs-Bedingungen auf 100 ccm Flüssigkeit verteilt, haben wir es für notwendig gehalten, auch nach einem Einfluß des Alkohols zu fahnden, zumal es sich aus den Arbeiten von Nogaki⁸⁾, sowie D. R. P. Murray und Ch. G. King⁹⁾ ergibt, daß dieses Spaltstück hemmend auf den Umsatz wirkt.

Unsere Versuche mit Alkohol-Zusatz liefern auch wirklich den Schlüssel zum Verständnis der Tatsache, daß trotz Abnahme der Racemat-Konzentration im Verlaufe der Spaltung der Sinn des optischen Auswählens nicht geändert wird. Denn bereits die Anwesenheit von 0.102 g Äthylalkohol in 100 ccm Reaktionsgemisch beeinflusst das optische Auswählen bei der Hydrolyse, und zwar in dem Sinne, daß der Umsatz des (+)-Esters in den Vordergrund tritt. So betragen zum Beispiel in Versuchen mit Leber-Esterase des Menschen die Werte für $[\alpha]_D$ der isolierten Mandelsäure bei annähernd gleichen Spaltungsgraden ohne Alkohol-Zusatz: -10^0 (Versuch 2 der Tabelle 2), bei Zusatz von Alkohol: $+15^0$ (Versuch 4); damit erreicht er fast den Wert der bei doppelter Racemat-Konzentration (0.8 g : 100 ccm) erzielten spezif. Drehung, der nach Versuch 1 $+20^0$ beträgt. Ein Vergleichs-Versuch (Nr. 3) mit *racem.* Säure (als Natriumsalz) führt in Übereinstimmung mit den Ronaschen Resultaten zu keiner nennenswerten Änderung des optischen Auswählens ($[\alpha]_D = -11^0$), und in einem Versuch mit Zusatz von Alkohol + Säure, entsprechend 0.4 g Racemat (Nr. 5), kommt hinsichtlich des Auswählens nur der Einfluß des Alkohols zur Geltung: $[\alpha]_D = +15^0$. Diese Ergebnisse sind bestätigt durch die Versuchs-Reihe 2 der Tabelle 2, ausgeführt mit Esterase aus Menschen-Leber 7, sowie durch die Versuchs-Reihe 3 mit Kaninchenleber-Esterase.

Zu dem gleichen Ergebnis über den Einfluß des Alkohols gelangt man auch durch eine andere Versuchs-Anordnung: Man entnimmt einer annähernd symmetrisch verlaufenden Racemat-Spaltung einen Teil des Versuchs-Ansatzes, verdünnt zu einem bestimmten Volumen mit Wasser und analysiert nach einer angemessenen, weiteren Versuchs-Dauer die Mandelsäure. Dann stellt man bei der Konzentration, bei welcher sich das Racemat im Augenblicke des Verdünnens befand, einen Vergleichs-Versuch mit gleicher Reaktions-Dauer an. Der Verdünnungs-Versuch unterscheidet sich von diesem

⁸⁾ Ztschr. physiol. Chem. 152, 101 [1926]; vergl. auch E. Bamann u. M. Schmeller, Ztschr. physiol. Chem. 183, 149 [1929], u. zw. 159.

⁹⁾ Biochem. Journ. Cambridge 24, 190 [1930].

Tabelle 2.
Einfluß von Äthylalkohol, sowie Mandelsäure auf die stereochemische Spezifität der Leber-Esterase des Menschen und des Kaninchens bei der Hydrolyse von *racem.* Mandelsäure-äthylester.
(Die Versuche 1 mit 9 sind mit 4.0 g, die Versuche 10—12 mit 2.0 g Phosphat, pH = 7 gepuffert; t = 25°.)

Ver- such	Herkunft des Enzyms	Lipase- Einheiten	Substrat- konzentrat. g : ccm	Zusätze	Reaktions- dauer (Stunden)	Spaltung (Proz.)	Dreh.-Winkel der Mandel- säure (10 ccm, l = 2 dm)	$[\alpha]_D$ der Mandelsäure	Hemmung d. Reaktionsge- schwindigkeit (Proz.)
1	Menschen-Leber 8	7	0.8 : 100	—	6	16.6	+0.46°	+20.5°	—
2	"	7	0.4 : 100	—	6	28.8	—0.20°	—10.3°	—
3	"	7	0.4 : 100	0.338 g Mandelsäure	6	23.4	—0.18°	—11.4°	19
4	"	7	0.4 : 100	0.102 g Alkohol	6	22.9	+0.23°	+14.9°	20
5	"	7	0.4 : 100	0.338 g Mandelsäure + 0.102 g Alkohol	6	20.7	+0.21°	+15.0°	28
6	Menschen-Leber 7	7	0.5 : 100	—	4	20.2	+0.08°	+4.7°	—
7	"	7	0.5 : 100	0.422 g Mandelsäure	5	23.0	+0.15°	+7.7°	9
8	"	7	0.5 : 100	0.128 g Alkohol	5	20.3	+0.42°	+24.5°	19
9	"	7	0.5 : 100	0.256 g Alkohol	5 1/2	18.7	+0.55°	+34.8°	33
10	Kaninchen-Leber (Mischpräparat)	60	0.7 : 50	—	3 3/4	19.6	+0.46°	+19.8°	—
11	"	60	0.7 : 50	0.591 g Mandelsäure	6 1/2	19.8	+0.61°	+26.1°	42
12	"	60	0.7 : 50	0.179 g Alkohol	5	19.4	+1.05°	+45.8°	26

Versuch nur dadurch, daß er noch die Spaltprodukte der vorhergehenden Hydrolyse enthält. Wie zu erwarten, wird dadurch die Spaltung des (+)-Esters begünstigt. Ein auf diese Weise ausgeführtes Beispiel stellen wir nachfolgend zusammen:

I. Verdünnungs-Versuch:

Versuchs-Ansatz:

1.0 g *racem.* Mandelsäure-äthylester
 8.0 g Phosphat-Puffer, $pH = 7$
 13 Einheiten (Menschen-Leber 7)
 ad 200 ccm Wasser; $t = 25^{\circ}$

Nach 11 Stdn. Entnahme u. Analyse von

100 ccm

Spaltung: 45.0%

α d. Mandelsäure: $+0.18^{\circ}$

$[\alpha]_D$ d. Mandelsäure: 4.7°

Die restlichen 100 ccm Reaktionsgemisch (enthaltend 0.275 g Ester) verdünnt zu 200 ccm; Analyse nach weiteren 5 Stdn. Versuchs-Dauer:

Spaltung: 24.1%

α d. Mandelsäure: -0.14°

Unter Berücksichtigung der schon vorhandenen (+)-Mandelsäure ($\alpha = +0.18^{\circ}$) ergibt sich ein Wert für $[\alpha]_D = -28.6^{\circ}$.

II. Vergleichs-Versuch:

0.275 g *racem.* Mandelsäure-ester
 4.0 g Phosphat-Puffer, $pH = 7$
 6.5 Einheiten
 ad 200 ccm Wasser; $t = 25^{\circ}$

Versuchs-Dauer 5 Stdn.

Spaltung: 29.9%

α d. Mandelsäure: -0.66°

$[\alpha]_D$ d. Mandelsäure: -47.7°

Die Alkohol-Menge im Verdünnungs-Versuch betrug nur 0.0575 g Äthylalkohol: 200 ccm Reaktionsflüssigkeit. Trotzdem bewirkte ihre Anwesenheit eine Differenz von 19° im $[\alpha]_D$ der Mandelsäure ($[\alpha]_D$ der Mandelsäure im Verdünnungs-Versuch = -28.6° gegenüber $[\alpha]_D$ im Vergleichs-Versuch = -47.7°).

Der Sinn des optischen Auswählens bleibt also wohl deshalb im Laufe der Verseifung positiv, weil mit der Verringerung der Ester-Konzentration die Zunahme der Konzentration des Alkohols verbunden ist, der das Auswählen nach der positiven Seite zu beeinflussen vermag. Nach der Aufdeckung dieses Einflusses des Spaltstückes Alkohol glauben wir, auch unser eigenes Bedenken bezüglich unserer Erklärungsweise der Abhängigkeit des optischen Auswählens von der Racemat-Konzentration zurückstellen zu dürfen.

Theoretische Folgerungen für den Mechanismus der enzymatischen Ester-Hydrolyse.

Der eben beschriebene Befund ist auch in allgemeinerer Hinsicht von Bedeutung. Murray und King haben in der bereits erwähnten Untersuchung: „Die Affinität der Leber-Esterase zu optisch aktiven Alkoholen“ gezeigt, daß spiegelbildliche Alkohole die enzymatische Verseifung niederer Fettsäure-ester ungleich stark hemmen. Daraus geht hervor, daß der Alkohol den Reaktions-Mechanismus nicht unspezifisch, etwa durch Veränderung des Reaktions-Milieus in physikalischer Hinsicht, beeinflußt, sondern daß die Hemmung ganz spezifischer Art ist. Das Naheliegende war die Annahme ungleich großer Affinitäten der optisch aktiven Alkohole zu dem Enzym. Da

Versuche bei verschiedener Ester-Konzentration Hemmungen nur in niederen Substrat-Konzentrationen ergaben und der Einfluß des Alkohols in höheren abnahm, führten ihn die genannten Forscher darauf zurück, daß der Alkohol als Konkurrent des Esters einen Teil des Enzyms von der Reaktion ausschließt. Damit käme also dem Alkohol die Bedeutung eines „Hemmungskörpers erster Art“ zu.

Bei einer so eindeutigen und übersichtlichen Lage der Reaktions-Verhältnisse könnte sich der Einfluß des Alkohols bei der Spaltung *racem.* Ester nur bezüglich der Umsatz-Geschwindigkeit äußern: das Spaltprodukt beschlag- nimmt einen Teil des Enzyms und schaltet es von der weiteren Reaktion aus, während der restliche Teil nun allein die Racemat-Verseifung bewirkt. Da nach unseren Befunden aber auch das optische Auswählen gestört ist, liegen Komplikationen im Reaktions-System vor. Sie scheinen von derselben Art zu sein, wie sie E. Bamann und M. Schmeller bei der Methyl-butyrat-Hydrolyse in Gegenwart von Indicator-Farbstoffen¹⁰⁾ und Lactonen¹¹⁾ gefunden haben. Die Analyse der Alkohol-Hemmung führt uns zu der Auffassung, daß sich dieses Spaltstück an das Enzym anlagert und einen Komplex mit anderen katalytischen Eigenschaften bildet. Die Änderung des stereochemischen Auswählens kann dann durch eine Änderung der Affinitäten dieses Komplexes gegenüber den Antipoden des Racemates oder der Zerfalls-Geschwindigkeiten der Enzym-Alkohol-(+)-Ester- bzw. Enzym-Alkohol-(−)-Ester-Verbindung zustande kommen. Wir glauben, die Erscheinung in der Hauptsache auf die letztgenannte Ursache zurückführen zu sollen. Dabei muß aber noch der Tatsache Rechnung getragen werden, daß nach unseren Erfahrungen beim Strychnin, bei Indicator-Farbstoffen und bei Lactonen, sowie nach den Befunden der englischen Forscher beim Alkohol mit der Erhöhung der Ester-Konzentration eine Ausschaltung des Einflusses der Zusatzstoffe einhergeht.

Das nun gewonnene Beobachtungsmaterial hinsichtlich der enzymatischen Ester-Verseifung veranlaßt, die Vorstellungen zu entwickeln, die wir uns über die bei der Katalyse sich am Substrat- und Enzym-Molekül abspielenden Vorgänge machen. Wir prüfen die Frage, ob es Anhaltspunkte für eine feste chemische Verankerung des Enzyms am Substrate gibt, und welche Gruppen des Substrates dafür verantwortlich sind, und wir untersuchen vor allem, ob Anzeichen für korrespondierende, chemisch wirksame Gruppen am Esterase-Molekül vorhanden sind, in welchen diejenigen Kräfte zentriert sind, die die Bindung des Enzyms an das Substrat bewirken, oder ob die Annahme von Affinitäts-Feldern ohne streng formulierbare Affinitäten den Vorzug verdient.

Der Zeitpunkt für diese Erörterung scheint nicht ungeeignet, da sich in jüngster Zeit A. K. Balls und F. Köhler¹²⁾ in einer Arbeit: „Über den Mechanismus der enzymatischen Dipeptid-Spaltung“, sowie E. Waldschmidt-Leitz und A. K. Balls¹³⁾ in einer Untersuchung: „Zur Frage nach den Ursachen sterischer Auslese durch Enzyme“ mit ähnlichen Fragen bei den proteolytischen Enzymen, speziell der tierischen Dipeptidase, befaßt haben. Auf Grund der erfolgreichen Arbeiten dieser Autoren kommt man

¹⁰⁾ Ztschr. physiol. Chem. **194**, 1 [1930/31].

¹¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **194**, 14 [1930/31].

¹²⁾ B. **64**, 34 [1931].

¹³⁾ B. **64**, 45 [1931].

bei der Dipeptidase zu der Auffassung, daß die Bindung des Enzyms an das Substrat nicht nur an der bisher bekannten Haftstelle, der freien Aminogruppe der Dipeptid-Komponente, zustande kommt, sondern daß daran die Iminogruppe als zweite Haftstelle für das Enzym beteiligt ist. Für die Spaltbarkeit des Peptids wird im Falle der „Anilin-Peptide“, das sind Peptide aus Amino-säure und substituiertem Anilin, der elektrochemische Charakter der NH-Gruppe als maßgebend¹⁴⁾ gefunden. Es ist demnach sehr anschaulich, dem Enzym in Übereinstimmung mit der „Zwei-Affinitäts-Theorie“ von H. v. Euler und K. Josephson¹⁵⁾ zwei haptophore Gruppen, von denen die an der Iminogruppe angreifende zugleich die funktionelle ist, zuzuschreiben. Für die mit der freien Aminogruppe in Beziehung tretende Gruppe des Enzyms hat sich die Vorstellung ableiten lassen, daß sie eine Aldehyd- bzw. Ketogruppe ist¹⁶⁾, wodurch sich die Verankerung des Enzyms unter Bildung einer Schiffischen Base vollzöge.

Im Falle der Esterasen läßt sich der Reaktions-Mechanismus im einzelnen noch nicht so weitgehend festlegen. Weiteres Eindringen auf diesem Gebiete kann wohl dazu führen, allgemeine Vorstellungen durch spezielle zu ersetzen, doch scheint es, daß die Esterasen, die in manchen anderen Punkten eine Sonderstellung gegenüber den Carbohydrasen und Proteasen einnehmen, auch hierin die Neigung zu Besonderheiten zeigen, auf die im folgenden hingewiesen sei.

An der Bindung des Substrates an das Enzym ist vornehmlich die Carbonylgruppe beteiligt, an der sich auch der Vorgang der Hydrolyse abspielt. Zur Annahme einer Verankerung an mehr als einer Stelle, von denen eine im Alkohol-Molekül liegen könnte, geben die bisherigen Befunde keinen Anlaß. Denn das Haften an der genannten Stelle genügt, um die wenig ausgeprägte Spezifität gegenüber Substraten verschiedenen Baues verstehen zu können, und auch die Konfigurations-Spezifität verlangt weder bei Substraten, deren asymmetrisches C-Atom der Säure angehört, noch bei solchen, deren Asymmetrie im Bau der Alkohol-Komponente begründet ist, mehr als eine Haftstelle. Wie weit man aus dem Verhalten einiger Esterasen gegenüber inneren Estern, den Lactonen, nämlich aus der bisher gefundenen Unspaltbarkeit, den entgegengesetzten Schluß ziehen darf, nämlich, daß Spaltbarkeit eines Substrates an das Vorhandensein einer Haftstelle in der zweiten Komponente des Substrates gebunden ist, ist vorerst mit Sicherheit nicht zu entscheiden. D. R. P. Murray¹⁷⁾ hat mit Ketonen, Aldehyden und einer Anzahl anderer Substanzen Hemmungs-Versuche ausgeführt; diese bestätigen das Enzym-Bindungsvermögen der Gruppe $>C:O$. Wie stellen sich nun die Bindungs-Verhältnisse am Esterase-Molekül dar? Die präzise Vorstellung, den in den Substraten und in anderen, mit dem Enzym reagierenden Substanzen vorhandenen wirksamen Gruppen lägen am Esterase-Molekül korrespondierende Gruppen gegenüber, kann die zahlreichen Beobachtungen über Reaktions-Beeinflussung nicht ungezwungen erklären. Da-

¹⁴⁾ Wir möchten weniger annehmen, daß der elektrochemische Charakter der Iminogruppe nur „auf die Affinität zum Enzym von Einfluß sei“; ist seine Bedeutung nicht vielmehr in dem Einfluß auf die Stabilität der Enzym-Substrat-Verbindung, also ihren Zerfall, zu suchen?

¹⁵⁾ Ztschr. physiol. Chem. **133**, 279 [1923/24].

¹⁶⁾ vergl. hierzu E. Waldschmidt-Leitz, Ztschr. angew. Chem. **43**, 377 [1930].

¹⁷⁾ Biochem. Journ. Cambridge **23**, 292 [1929].

gegen vermag dies die Annahme gewisser Kraftfelder, welche durch die molekulare Zusammensetzung des Enzym-Moleküls zustande kommen.

Diese Vorstellung gestattet vor allem die Möglichkeit der Verbindung eines Enzym-Moleküls mit nicht nur einem, sondern auch mit 2, 3 und mehreren Substrat-Molekülen. In diesem Sinne deuten wir die Abweichungen unserer Affinitäts-Kurven von Dissoziations-Restkurven: einerseits das verzögerte Ansteigen und andererseits das Abfallen vieler Kurven in hohen Substrat-Konzentrationen. Die in diesen Gebieten auftretende Hemmung der Umsatz-Geschwindigkeit ist sicher nicht ausschließlich, auch nicht in der Hauptsache auf physikalische Beeinflussung des Milieus, sondern auf die Bildung von anderen Enzym-Substrat-Komplexen, etwa vom Typus $[ES]S$, $[ES]S_2$ mit geringerer Zerfalls-Geschwindigkeit zurückzuführen.

Sind aber die Residual-affinitäten des Enzyms erschöpft, so muß sich trotz Erhöhung der Substrat-Konzentration eine konstante Zerfalls-Geschwindigkeit der gebildeten komplexen Enzym-Substrat-Verbindung einstellen, wofür die Experimente auch die Bestätigung zu liefern scheinen. In dieser Anschauung werden wir bestärkt durch die Ergebnisse noch unveröffentlichter Versuche von E. Bamann und M. Schmeller¹⁸⁾, aus denen hervorgeht, daß bei Zusatz von Benzoyl-essigsäure-ester der bei der Methyl-butyrat-Spaltung durch Schafleber-Esterase auftretende Abfall der Aktivitäts- p_5 -Kurve fast aufgehoben wird. Trotz Substrat-Vermehrung (durch Zusatz eines zweiten Esters) tritt hier keine Erhöhung, sondern ein Verschwinden des Hemmungs-Effektes ein. Diese Tatsache ist nur so zu erklären, daß das Zustandekommen der $[ES]S$ -Komplexe durch die Anwesenheit eines zweiten Substrates (S_1) gestört wird, beispielsweise durch die Bildung von $[ES]S_1$, $[ES]S_2$ und ähnlichen Komplexen, welche durch eine höhere Zerfalls-Geschwindigkeit ausgezeichnet sind. Solche gegenseitige Beeinflussung zweier in Lösung befindlicher Substrate könnte auch bei den Racemat-Spaltungen unter bestimmten Verhältnissen auftreten. Doch haben wir bisher noch keine Anhaltspunkte für größere Unstimmigkeiten zwischen dem Verhalten der einzelnen aktiven Ester und dem des Racemates beobachtet.

Ähnlich wie die Wirkung überschüssigen Substrates ist die von anderen Substanzen. So werden Strychnin, Alkohol und Indicator-Farbstoffe auf Grund der vorhandenen Restaffinitäten an die Enzym-Substrat-Verbindung gebunden. Die Zerfalls-Geschwindigkeit dieser Komplexe kann gegenüber derjenigen der Enzym-Substrat-Verbindung eine erhöhte sein, wie es sich bei Zusatz von Strychnin zum Reaktionssystem Mandelsäure-ester—Leber-Esterase des Menschen, oder bei Zusatz von Benzoyl-essigsäure-ester zum System Buttersäure-ester—Schafleber-Esterase, oder endlich bei Zusatz von Phthalein-Farbstoffen in ihrer chinoiden Form zum System Buttersäure-ester—Leber-Esterase zeigt, oder die Zerfalls-Geschwindigkeit kann eine verminderte sein, wie sie der Zusatz von Alkohol, von Phthalein-Farbstoffen in der Lacton-Form und vielfach auch von weiterem Substrat bewirkt.

¹⁸⁾ M. Schmeller, Inaug.-Dissertat., Universität München, Dezember 1930, u. zw. Abschn. B.

Die Annahme wechselnder Bindungs-Möglichkeit auf Grund von Affinitäts-Anteilen trägt einer weiteren Eigenschaft der Aktivitäts- p_s -Kurven Rechnung: Bei Zusatz von Hemmungs-Körpern läuft die Kurve mit jener ohne Zusatz in höheren Substrat-Konzentrationen zusammen (Murray: Alkohol, Bamann und Schmeller: Indicator-Farbstoffe, Lactone). Das bedeutet nichts anderes als eine Verdrängung und Ausschaltung des Zusatzstoffes, während an seine Stelle das Substrat selbst tritt. Unter diesem Gesichtspunkt ist auch die von Bamann und Laeverenz gemachte Beobachtung zu verstehen, daß durch die Erhöhung der Konzentration des *rac.* Mandelsäure-esters der Einfluß von Strychnin auf das optische Auswählen fast ganz ausgeschaltet wird. Die lose Verankerung des Fremdkörpers am Enzym geht auch aus der Leichtigkeit hervor, mit welcher er durch Dialyse vom Enzym wieder zu trennen ist.

Im Anschluß an diese Erörterungen wollen wir noch prüfen, ob nicht etwa auch der wichtige Befund der „ausgleichenden Aktivierung“ von dem entwickelten einheitlichen Gesichtspunkte aus zu verstehen ist. R. Willstätter und seine Mitarbeiter¹⁹⁾ haben gezeigt, daß bei einigen fettspaltenden Enzymen, nämlich der Pankreas- und Magen-Lipase, Zusätze bestimmter Art ein Reaktions-System schaffen können, das die Wirkung zufälliger Aktivatoren und Hemmungs-Körper ausschaltet und damit die Bestimmung und den Mengen-Vergleich eines Enzyms auf eine sicherere Grundlage stellt. Die Wirkungsweise dieser Zusätze ist im wesentlichen die Verbesserung der Adsorptions-Verhältnisse für Fett und Lipase und vollzieht sich auf der Oberfläche der Kolloidteilchen. Zusätze derselben Art zu Leber-Esterase hemmen nach den Befunden von R. Willstätter und F. Memmen²⁰⁾ das Wirkungsvermögen dieser Enzyme gegenüber Tributyrin, während sie nach H. Kraut und H. Rubenbauer²¹⁾ auf die Methyl-butyrat-Spaltung ohne Einfluß sind. Es ist zu untersuchen, ob das optische Auswählen gewisser Esterasen durch den Zusatz dieser Stoffe, besonders der oberflächen-aktiven Kalkseife, geändert wird. Der Versuch scheint aussichtsreich. Man müßte wohl folgern, daß auf der aktiven Oberfläche der Kolloidteilchen eine Anreicherung des Substrates eintrete und auf Grund dieser höheren Substrat-Konzentration am Reaktionsort dann das stereochemische Auswählen sich wie bekannt ändere.

Die theoretischen Überlegungen, die wir auf unseren experimentellen Beobachtungen aufgebaut haben, verlangen eine breitere Basis als sie das Massenwirkungs-Gesetz abgibt. Auf eine Einschränkung in der Anwendung des Massenwirkungs-Gesetzes auf Enzym-Reaktionen hat in der letzten Zeit besonders R. Weidenhagen²²⁾ hingewiesen. Wir teilen im Hinblick auf die Messungs-Ergebnisse bei den Leber-Esterasen die Ansicht, daß diese Einschränkung „zumindest in der feineren Auswertung der mit seiner Hilfe ermittelten Ergebnisse“ erforderlich ist, und daß sie sich hauptsächlich auf die Schlußfolgerungen über die Natur der verschiedenartigen Hemmungen erstreckt. Es bleibt zu prüfen, ob die auf den verschiedenen Gebieten der

¹⁹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **125**, 93 [1923], **129**, 1 [1923], **133**, 247 [1924], **140**, 203 [1924].

²⁰⁾ Ztschr. physiol. Chem. **138**, 216 [1924].

²¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **173**, 103 [1928].

²²⁾ Über d. Spezifität u. d. Wirkungsmechanismus d. zucker-spaltend. Enzyme. Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. **79**, 115 [1929].

Enzym-Chemie gefundenen, schwieriger zu klärenden Beobachtungen vom Standpunkte der heterogenen Katalyse, etwa in Anlehnung an die Langmuirsche Adsorptions-Isotherme, besser zu verstehen und zu formulieren sind²³). Im übrigen wird die Enzym-Chemie auf der Suche nach Erklärungsweisen für das komplizierte Tatsachenmaterial besonders hinsichtlich der hier behandelten Fragen die Anregungen verwerten können, die R. Willstätter in seiner Faraday-Vorlesung²⁴) niedergelegt hat.

Der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft sprechen wir für die Förderung unserer Untersuchungen aufrichtigen Dank aus.

132. Reinhard Seka und Paula Kallir: Synthese des Scopoletins:

[Aus d. II. Chem. Universitäts-Laborat. in Wien u. d. Institut für organ.-chem. Technologie d. Techn. Hochschule in Graz.]

(Eingegangen am 21. Januar 1931.)

Das Scopoletin ist ein in vielen Pflanzen vorkommender Stoff, der seinen Namen seiner Auffindung in *Scopolia japonica* durch Eykman¹⁾ verdankt. Auch die in *Atropa belladonna* vorkommende Chrysatropasäure von Kunz²⁾, sowie die aus *Gelsemium sempervirens* isolierte Gelseminsäure³⁾ sind mit Scopoletin identisch. Andere Vorkommen, die zum Teil noch einer näheren Überprüfung bedürfen, sind z. B. der Schillerstoff aus *Atropa belladonna* von Faßbender⁴⁾, der nach Paschkis⁵⁾ mit Scopoletin identisch ist; aus *Fabiana imbricata* konnte Kunz-Krause⁶⁾ einen äsculin-artig fluoreszierenden Stoff isolieren, aus dem ein Äsculetin-monomethyläther abgespalten werden konnte, der mit Scopoletin identisch sein soll. In *Jalape* wurde das Scopoletin durch Power und Rogerson⁷⁾ aufgefunden, und auch in der Rinde von *Prunus serotina* soll es nach Power und Moore⁸⁾ enthalten sein.

Bevor nun an die Synthese herangetreten werden konnte, war es notwendig, Scopoletin selbst als Vergleichsmaterial zu besitzen. Hierzu wurde in Anlehnung an das in großem Stil ausgebaute Verfahren von Moore⁹⁾, der aus 49.5 kg Wurzelmaterial von *Gelsemium sempervirens* 5 g

²³) vergl. hierzu: D. J. Hitchcock, Journ. Amer. chem. Soc. **48**, 2870 [1926], sowie R. Weidenhagen u. E. Launt, Ztschr. Ver. Dtsch. Zuckerind. **80**, 25 [1930].

²⁴) Journ. chem. Soc. London **1927**, 1359; Naturwiss. **15**, 585 [1927]. R. Willstätter, Untersuchungen über Enzyme, [Berlin, Julius Springer, 1928], Bd. I, S. 3 mit 24; siehe ferner R. Willstätter, Lebensvorgänge und technische Methoden, Österr. Chem.-Ztg. **32**, Nr. 13 [1929].

¹⁾ Eykman, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **3**, 171 [1884]; B. **17**, 442 [1884].

²⁾ Kunz, Arch. Pharmaz. **223**, 721 [1885].

³⁾ Wormley, Amer. Journ. Pharmac. **42**, 1 [1870]; C. **1870**, 678. — Schmidt, Arch. Pharmaz. **236**, 324 [1898]. — Ch. Watson Moore, Journ. chem. Soc. London **97**, 2223 [1910].

⁴⁾ Faßbender, B. **9**, 1357 [1876].

⁵⁾ Paschkis, Arch. Pharmaz. **223**, 541 [1885], **224**, 155 [1886].

⁶⁾ Kunz-Krause, Arch. Pharmaz. **237**, 1 [1899].

⁷⁾ Power u. Rogerson, Journ. Amer. chem. Soc. **32**, 93 [1910].

⁸⁾ Power u. Moore, Journ. chem. Soc. London **95**, 243 [1909].

⁹⁾ Ch. Watson Moore, Journ. chem. Soc. London **97**, 2223 [1910].