

Nicht für den Austausch

Zur Frage nach dem natürlichen Aufbau und der künstlichen Synthese der Enzyme

Von der
Technischen Hochschule Stuttgart
zur
Erlangung der Würde eines Doktor-Ingenieurs
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Dipl.-Ing. Charlotte Feichtner
aus Karlsruhe in Baden

Berichtersteller: Prof. Dr.Dr. R. Fricke
Mitberichtersteller: Prof. Dr. G. Grube
Tag der Einreichung: 20. November 1936

Zur Frage nach dem natürlichen Aufbau und der künstlichen Synthese der Enzyme

Von der
Technischen Hochschule Stuttgart
zur
Erlangung der Würde eines Doktor-Ingenieurs
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Dipl.-Ing. Charlotte Feichtner
aus Karlsruhe in Baden

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. R. Fricke
Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Grube
Tag der Einreichung: 20. November 1936

Die Arbeit erscheint im 288. Band, 1936, Seiten 70—78, 295—298 und
310—316 der *Biochemischen Zeitschrift*;
herausgegeben von *W. Graßmann*, Dresden;

ISBN 978-3-662-27933-5

ISBN 978-3-662-29441-3 (eBook)

DOI 10.1007/978-3-662-29441-3

Meinem Vater in Dankbarkeit!

Die vorliegende Untersuchung wurde im Laboratorium für organische und pharmazeutische Chemie der Technischen Hochschule Stuttgart bei

Herrn Professor Dr. *Eugen Bamann*

begonnen und nach seiner Berufung an die Universität Tübingen in der pharmazeutischen Abteilung des Chemischen Instituts der Universität Tübingen beendet.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. *Eugen Bamann*, danke ich ergebenst für das stete Entgegenkommen und die freundliche Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit.

Inhaltsübersicht.

Zur Frage nach dem natürlichen Aufbau und der künstlichen Synthese der Enzyme.

Einführung.

- I. Die Konfigurationsspezifität einer „komponierten“ Esterase.
- II. Autokatalytischer Anstieg der Umsatzgeschwindigkeit bei der Esterspaltung durch Pankreaslipase und seine Ursache.
- III. Ueber einen auffallenden Befund bei der gleichzeitigen Einwirkung von Pankreaslipase und Leberesterase (des Menschen) auf einen racemischen Ester.
- IV. Zur Kenntnis der stereochemischen Spezifität der menschlichen Pankreaslipase.

Einführung.

Die Untersuchungen, über deren Ergebnisse in der vorliegenden Dissertation berichtet wird, stellen einen Beitrag zu der grundsätzlichen Frage nach dem natürlichen Aufbau und der künstlichen Synthese der Enzyme dar.

Unter den verschiedenen, physiologisch hochaktiven Wirkstoffen grenzt man heute als „Enzyme“ die kolloiden Katalysatoren biologischer Provenienz ab. Bezüglich ihrer Struktur und ihres Aufbaus werden gegenwärtig hauptsächlich zwei Auffassungen vertreten. Nach der vor allem durch *R. Willstätter* und seine Schule entwickelten dualistischen Theorie baut sich ein Enzym auf aus seinem Träger, der keinerlei Enzymwirkung besitzt, und der spezifisch wirksamen Gruppe, die erst in ihrer Vereinigung mit dem kolloiden Träger das in seiner Wirkungsweise untersuchte Enzym darstellt. Die zweite, die sogenannte unitarische Theorie, wird vor allem von den Forschern *I. B. Sumner* sowie *J. H. Northrop* vertreten, indem sie die von ihnen isolierten kristallisierten Proteine als einheitliche chemische Verbindungen betrachten und für die Enzyme selbst halten.

Aus der „Trägertheorie“ von *R. Willstätter* ergibt sich die Frage, ob die aktive Gruppe eines Enzyms in jedem Falle mit einem ganz bestimmten Kolloid, z. B. einem Protein bestimmter Art verbunden ist, oder ob ein und dieselbe aktive Gruppe nicht mit verschiedenartigen kolloiden Trägern zu einem neuen Kombinat zusammentreten kann. Nach der Trägertheorie bedingt die aktive Gruppe die Spezifität des Enzyms, führt also zur Unterscheidung von zucker-, ester-, eiweißspaltenden Enzymen, während die Vereinigung von Wirkgruppe mit dem kolloiden Träger die feineren Unterschiede im Wirkungsvermögen bedingen soll.

Diese dualistische Auffassung vom Aufbau der Enzyme findet außer anderen neueren*) Arbeiten besonders durch eine Arbeit von *H. Kraut*

*) Wir erwähnen vor allem die im Anschluß an die Arbeiten von *O. Warburg* und *W. Christian* über das gelbe Atmungsferment (*Biochem. Z.* 254, 438, 1932) durch *H. Theorell* ausgeführten Untersuchungen über die „Reindarstellung des gelben Atmungsfermentes und die reversible Spaltung desselben“ (*Biochem. Z.* 272, 155, 1934) in eine Farbstoff- und eine Eiweißkomponente, sowie die „Reindarstellung der Wirkgruppe des gelben Fermentes“ (*Biochem. Z.* 275, 344, 1934) in Form eines Monophosphorsäureesters des Flavins und die Resynthese des gelben Atmungsfermentes bei der Vereinigung der isolierten Wirkgruppe mit dem Eiweißträger (*Biochem. Z.* 278, 263, 1935). Vgl. dazu *R. Kuhn* und *H. Rudy*: „Katalytische Wirkung der Lactoflavin-5-phosphorsäure; Synthese des gelben Ferments“ (*Ber.* 69, 1975, 1936), sowie *R. Kuhn*, *H. Rudy* und *F. Weygand*: „Ueber die Bildung eines künstlichen Ferments aus 6,7-Dimethyl-9-l-araboflavin-5'-phosphorsäure“ (*Ber.* 69, 2034, 1936).

O. Warburg, *W. Christian* und *A. Griese* gelang es in der Arbeit über die „Wirkungsgruppe des Co-Fermentes aus roten Blutzellen“

und *W. von Pantschenko-Jurewicz*: „Ueber die Struktur und Eigenschaften der Esterasen“ eine weitgehende Begründung; die genannten Forscher beschreiben nämlich die „Synthese“ von Leberesterase aus der inaktiven „Trägersubstanz“ und der „aktiven Gruppe“ des Pankreasenzym. In ihrem Verfahren wird das „Pheron“, gewonnen aus Leber, mit dem aus Pankreaslipase erhaltenen „Agon“ zu neuem „Leberesterase-Symplex“ vereinigt. Die Autoren erweitern die dualistische Auffassung durch einen neuen wesentlichen Punkt: Das Enzymsystem stelle ein durch das Massenwirkungsgesetz geregeltes Nebeneinander des Symplexes mit den freien Komponenten dar. Wenn diese These zu Recht besteht, ist nicht nur ein entscheidender Einblick in die Struktur der Enzyme gewonnen, sondern auch der Weg für Teilsynthesen gewiesen.

Zu diesen wichtigen Problemen haben wir eine entscheidende Stellungnahme gewonnen, indem wir die optische Spezifität des neu aufgebauten Enzyms studierten und sie vor allem mit der des natürlichen Enzyms verglichen. Das Ergebnis dieser Untersuchung behandelt das Kapitel: „Die Konfigurationsspezifität einer ‚komponierten‘ Esterase“.

Eine Bestätigung der gewonnenen Einsicht sehen wir in der im anschließenden Kapitel mitgeteilten Arbeit, die über den autokatalytischen Anstieg der Umsatzgeschwindigkeit bei der Esterspaltung durch Pankreaslipase und seine Ursache berichtet.

Schließlich erlauben auch die exakten Ergebnisse weiterer Untersuchungen einen Rückschluß auf das zur Erörterung gestellte Problem. Es handelt das folgende Kapitel: „Ueber einen auffallenden Befund bei der gleichzeitigen Einwirkung von Pankreaslipase und Leberesterase (des Menschen) auf einen racemischen Ester“; das letzte Kapitel liefert einen Beitrag „Zur Kenntnis der stereochemischen Spezifität der menschlichen Pankreaslipase“.

(Biochem. Z. 279, 143, 1935) die aktive Gruppe in diesem Fall als einen Pyridinkörper zu charakterisieren, der zu seiner Wirkung als Ferment der Verknüpfung mit einem Protein bedarf. Inzwischen wurde durch *O. Warburg*, *W. Christian* und *A. Griese* die Wirkgruppe des Co-Fermentes isoliert (Biochem. Z. 282, 157, 1935). Sie zeigt nur in Gegenwart von besonderen Proteinen, sogenannten „Zwischenfermenten“ ihre Wirksamkeit als Co-Ferment. Vgl. dazu: *E. Negelein* und *W. Gerischer*: „Verbesserte Methode zur Darstellung des Zwischenfermentes aus Hefe“ (Biochem. Z. 284, 289, 1936). Ferner: *O. Warburg* und *W. Christian*: „Gärungs-Co-Ferment“ (Biochem. Z. 285, 156, 1936).

K. Agner (Z. physiol. Chem. 235, 2, 1935) hat weiterhin nachgewiesen, daß die Katalase aus einer Farbstoffkomponente und einem Eiweißträger besteht, und erst die Vereinigung der beiden Komponenten katalatische Wirksamkeit zeigt.

**Die Konfigurations-Spezifität einer „komponierten“ Esterase.
(Zur Frage nach dem natürlichen Aufbau und der künstlichen Synthese
der Enzyme.)**

X. Mitteilung¹:

Über asymmetrische Esterhydrolyse durch Enzyme.

Von

Eugen Bamann und Charlotte Feichtner.

(Aus der Pharmazeutischen Abteilung des Chemischen Laboratoriums der
Universität Tübingen.)

(Eingegangen am 22. August 1936.)

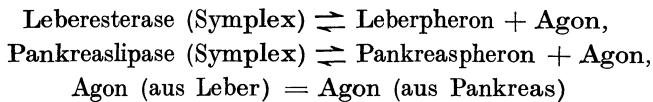
Theoretischer Teil.

Vor etwa zwei Jahren haben *H. Kraut* und *W. v. Pantschenko-Jurewicz*² die „Synthese“ von Leberesterase aus der inaktiven „Träger-substanz“ des Leberenzym und der „aktiven Gruppe“ des Pankreasenzym beschrieben. Diesem Verfahren liegt die Auffassung zu Grunde, daß die Enzyme nicht aus einer einzelnen chemischen Verbindung, sondern einem „Stoffsystem“, nämlich der Vereinigung von Träger („Pheron“) und aktiver Gruppe („Agon“) zum „Symplex“ bestünden und daß weiterhin das *Enzymssystem ein durch das Massenwirkungsgesetz geregeltes Nebeneinander des Symplexes mit den freien Komponenten darstelle*. Für die esterspaltenden Enzyme wird ein von Vorkommnis zu Vorkommnis wechselnder Träger, jedoch gleiches Agon angenommen. Die Spezifität der Enzyme einer Gruppe ist nach verschiedenen Erfahrungen eine Funktion der mit dem Agon im Symplex vereinigten Träger. Es war im Falle der untersuchten Enzymssysteme deshalb ohne weiteres zu erwarten, daß der aus dem (unwirksamen) „Pheron“ des Leberenzym und dem „Agon“ des Pankreasenzym künstlich dargestellte Enzymkomplex außer anderen Eigenschaften auch die Spezifität der Leberesterase zeigt: in bezug auf die Spaltung von Tributyrin und Buttersäuremethylester überwiegt tatsächlich die Wirksamkeit gegenüber dem einfachen Ester.

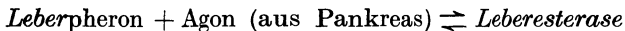
Zu einem besonders überzeugenden Beweis konnten nun nach unserer Ansicht Versuche werden, die zur näheren Charakterisierung der „synthetisierten“ Esterase die *optische* (Konfigurations-) Spezifität heranzogen. Diese Untersuchung haben wir im Einvernehmen mit den genannten Autoren durchgeführt. Bekanntlich lassen sich Leberesterase und Pankreaslipase (beide vom Schwein) dadurch unter-

¹ IX., VIII., VII. Mitteilung dieser Reihe: Zeitschr. f. physiol. Chem. 223, 185, 1934; 215, 142, 1933; 215, 121, 1933. — ² Diese Zeitschr. 275, 114, 1934.

scheiden, daß sie bei der Einwirkung auf gewisse racemische Ester gerade die entgegengesetzte Komponente des Racemates bevorzugt spalten. Im Falle des Mandelsäureäthylesters sind die reaktionskinetischen Verhältnisse, die diese „optische Spezifität“ bedingen, genau bekannt. Wenn sich nun „Leberesterase“ und „Pankreaslipase“ durch das Reaktionsschema:



wiedergeben lassen und die künstliche Vereinigung der isolierten Komponenten



sich in so übersichtlicher und einfacher Form vollzieht, dann sollte die „synthetisierte Leberesterase“ auch die optische Spezifität der natürlichen Leberesterase zeigen. *Das trifft aber, wie sich aus zahlreichen Versuchen in eindeutiger Weise ergeben hat, nicht zu.*

Behalten wir die *Krautsche* Vorstellung von der Dissoziation des Symplexes in Agon und Pheron bei, so muß aus unseren Versuchsergebnissen geschlossen werden, daß der Zusammentritt zum Symplex allein noch nicht das Entscheidende ist, sondern daß die Art der jeweiligen Verankerung der Wirkgruppe am kolloiden Träger von ausschlaggebender Bedeutung ist. Nur dann erscheint es verständlich, daß das stereochemische Auswählen des komponierten Enzyms verschieden ist von dem des natürlichen. Diese Annahme würde sich auch der von *G. M. Schwab*, *E. Bamann* und *P. Laeverenz*¹ vor mehreren Jahren entwickelten Auffassung einfügen, wonach „dieselbe katalytisch aktive Gruppe je nach ihrer Lage an demselben kolloiden Träger verschiedenartige Feldwirkungen ausübt“. Im Rahmen der *Krautschen* Vorstellungen würden unsere Befunde so zu deuten sein, daß es wohl gelingt, die Lipase der Leber und der Bauchspeicheldrüse in kolloiden Träger und Wirkgruppe zu zerlegen, daß aber die Wiedervereinigung der Komponenten nicht nach der Art der Salzbindung bei Störung des Massenwirkungsgleichgewichts einer chemischen Verbindung erfolgt, sondern die Bindung des Agons am Pheron an verschiedenen Stellen eintritt, was die feineren Unterschiede der Spezifität des neugebildeten Enzyms zur Folge hat.

Ob die durch ihre Einfachheit gewinnende Anschauung vom „Gleichgewicht zwischen Agon, Pheron und Symplex“ und von der chemischen Einheitlichkeit der einem bestimmten Enzym zugehörenden Träger den Aufbau der Enzyme richtig kennzeichnet, ist auf Grund der vorliegenden Untersuchung nicht zu entscheiden. Einige unserer früheren Arbeiten,

¹ Zeitschr. f. physiol. Chem. 215, 121, 1933.

z. B. über die Konfigurationsspezifität der Leberesterase¹, über pankreatische Lyo- und Desmolipasen², über die protoplasmatische Verankerung der Leberesterase³ oder über die verschiedenen Lyo- und Desmolekomplexe der tierischen Phosphoesterase⁴, haben uns ein komplizierteres⁵ Bild vom Aufbau der Enzyme vermittelt. Wir nehmen an, daß der engere kolloidale Träger der Wirkgruppe mit verschiedenen anderen hochmolekularen Stoffen assoziiert vorkommt oder daß er mit Eiweißgruppen oder anderen hochmolekularen Stoffen chemisch verbunden sein kann⁶. Anlagerungen oder Abdissoziationen bestimmter Substanzen führen zu Veränderungen am Enzymsymplex, die sich in den Eigenschaften, beispielsweise der Spezifität des Enzyms, bemerkbar machen können. Daß eine Dissoziation zwischen der Wirkgruppe selbst und dem engeren kolloidalen Träger eintritt, dafür haben sich in unseren bisherigen Untersuchungen noch keine Anhaltspunkte ergeben. Beim Studium der menschlichen Leberesterase sind wir sogar zu der Auffassung gelangt, „daß in gewissen Enzymen nicht diskrete wirkende Gruppen mit scharf bestimmten Affinitäten und Zerfallskonstanten vorliegen, sondern eine kontinuierliche Mannigfaltigkeit von Stellen abgestufter Wirksamkeit der aktiven Gruppe, wie man sie bei makroheterogenen Adsorbentien und Katalysatoren in den „aktiven Zentren“ schon länger kennt.“

Experimenteller Teil.

I. Das Enzymmaterial.

a) *Darstellung und Reinigung der Leberesterase.* Das Ausgangsmaterial für die Herstellung der Enzymlösungen war das aus vier Schweinelebern gewonnene Aceton-Äther-Trockenpräparat. Für die Nachprüfung der am Mischpräparat erhobenen Befunde stellten wir uns auch ein Trockenpräparat aus nur einer Leber her. Daraus gewannen wir Auszüge durch zweistündige Extraktion mit der 40fachen Menge n/40 Ammoniaklösung bei Zimmer-temperatur. Die *Reinigung* der Leberextrakte zum Zwecke der Gewinnung pheronreicher Lösungen erfolgte entsprechend den Angaben von *Kraut* und *v. Pantschenko-Jurewicz*. Wir ergänzen die Angaben dieser Autoren mit dem Hinweis, daß das Mengenverhältnis, in dem die Lösungen von Bleiacetat und Diammonphosphat bei den Adsorptionen angewandt werden, Schwankungen unterliegen kann. Meistens benötigten wir etwas weniger an Bleiacetatlösung als es die Angabe vorsieht. Es empfiehlt sich daher, durch Vorversuche die jeweils notwendige Menge Bleiacetat zu ermitteln.

¹ Siehe besonders VII. Mitteilung dieser Reihe. — ² *E. Bamann* u. *P. Laeverenz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **223**, 1, 1934. — ³ *E. Bamann* u. *J. N. Mukherjee*, ebenda **229**, 1, 1934; *E. Bamann*, *J. N. Mukherjee* u. *L. Vogel*, ebenda **229**, 15, 1934. — ⁴ *E. Bamann*, *E. Riedel* u. *K. Diederichs*, ebenda **230**, 175, 1934, und zwar S. 180. — ⁵ In der II. Abh. „Über Struktur und Eigenschaften der Esterasen“ stoßen auch *Kraut* und *v. Pantschenko-Jurewicz* auf verwickeltere Verhältnisse; diese Zeitschr. **285**, 407, 1936. — ⁶ Siehe *R. Willstätter* u. *M. Rohdewald*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **218**, 79, 1933.

Tabelle I. Reinigung der Leberesterase durch Voradsorption mittels Bleiphosphat.

Leberrohlösung		I. Voradsorption			II. Voradsorption		
E. E. in 1 ccm	E. W.	E. E. in 1 ccm	E. W.	Ausbeute %	E. E. in 1 ccm	E. W.	Ausbeute %
2,26	3,0	1,03	22,5	61,5	0,68	31,0	64
2,26	2,6	1,05	15,4	60,0	0,97	30,0	89
2,26	2,7	1,20	51,0	54,5	0,45	50,0	44
2,95	2,3	1,82	13,0	73,5	1,59	25,3	87
2,05	3,8	1,14	19,7	67,5	0,97	44,0	82

Die voradsorbierten Lösungen, die ein p_H von etwa 4,5 zeigten, haben wir zur besseren Erhaltung der enzymatischen Wirksamkeit vor der Weiterbehandlung mit Kieselgur auf ein p_H von 6,8 bis 6,9 gebracht.

b) Gewinnung der Pankreaslipase. Wir extrahierten das Aceton-Äther-Trockenpräparat, gewonnen aus einer Anzahl Schweinepankreasdrüsen, während eines Tages mit der 20fachen Menge 86%igen Glycerins bei Zimmertemperatur und trennten dann den Glycerinextrakt durch Abseihen und Zentrifugieren ab. Die für die Synthesversuche benötigten agonreichen Lösungen wurden, nachdem die Extrakte blank filtriert waren, durch Verdünnen mit Wasser auf das Zehnfache und Abzentrifugieren des sich ausscheidenden eiweißhaltigen Niederschlags erhalten.

II. Die Enzymsynthese nach Kraut und v. Pantschenko-Jurewicz.

Die Befunde bei einer Reihe von Versuchen, zusammengestellt in Tabelle II, bestätigen die Ergebnisse von Kraut und v. Pantschenko-

Tabelle II. Zunahme der Wirksamkeit gegenüber Buttersäuremethylester.

Nr.	Vorbehandelte Leberlösung E. E. in 5 ccm	Verdünter Pankreas-glycerin-auszug E. E. in 5 ccm	Lösung nach Mischen von 25 ccm vorbehandelter Leberlösung und 25 ccm verdünntem Pankreasextrakt				Zuwachs an E. E. %
			E. E. in 10 ccm	E. E. berechnet	E. E. gefunden		
				für Gesamtmenge der Mischung			
1	3,14	0	3,40	15,70	17,00	8,3	
2	1,30	0	1,50	6,50	7,50	15,4	
3	4,50	0	4,72	22,50	23,50	4,5	
4	1,25	0	1,40	6,25	7,00	12,0	
5	2,31	0	2,50	11,60	12,50	7,8	
6	1,91	0	2,24	9,55	11,20	17,3	
7	3,41	0	3,86	17,05	19,30	13,2	
8	3,43	0	3,64	17,15	18,20	6,1	
9	3,02	0	3,40	15,10	17,00	12,6	
10	0,91	0	1,10	4,55	5,50	20,9	
11	1,64	0	1,88	8,20	9,40	14,6	
12	2,25	0	2,50	11,50	12,50	8,7	
13	2,73	0,05	3,40	13,90	17,00	22,3	
14	2,30	0	2,64	11,50	13,20	14,8	
15	1,36	0,05	1,90	7,00	9,50	35,5	
16	2,00	0	2,50	10,00	12,50	25,0	
17 ¹	3,87	0	4,32	19,35	21,60	11,6	
18 ¹	3,64	0	4,10	18,20	20,50	12,6	

¹ Versuche mit dem einheitlichen Aceton-Trockenpräparat.

Jurewicz: Beim Zusammenbringen der vorbehandelten Leberlösung mit verdünntem Pankreasglycerinauszug beobachtet man eine höhere Wirkung gegenüber Buttersäuremethylester als man auf Grund der Bestimmungen im Falle der beiden Komponenten erwartet. *Der Zuwachs in unseren Versuchen betrug zwischen 4 und 35%.*

Um bei den Messungen größte Genauigkeit zu erzielen, kamen von den verdünnten Pankreasextrakten sowie von den Lösungen, in denen sich Synthese vollziehen soll, jeweils 5 bis 10 ccm zur Anwendung. Der Aziditätszuwachs bei der Methylbutyratspaltung wurde mit Hilfe von n/10 Kalilauge und eines Mischindicators, bestehend aus je einem Teil Bromkresolpurpur und Bromthymolblau, ermittelt.

III. Charakterisierung der Enzymlösungen; optische Spezifität.

a) *Beständigkeit der Enzymlösungen.* Für die Beurteilung der Racematspaltung ist die Kenntnis der Beständigkeit des neugebildeten Enzyms erwünscht. Deshalb haben wir die enzymatische Wirksamkeit in den Mischungen von Leber- und Pankreaslösungen unter den gleichen äußeren Bedingungen wie bei der Racematspaltung während mehrerer Stunden verfolgt und zum Vergleich die Beständigkeit der vorbehandelten Leberlösungen allein beobachtet. Während die Wirksamkeit dieser Lösungen auch nach einem Tage noch völlig unverändert war, zeigte sich in den Mischlösungen in den meisten Fällen ein deutlich merkbarer Rückgang (Tabelle III). Mit Vorbehalt könnte man bereits aus diesem Befunde auf feinere Unterschiede im Aufbau des natürlichen und des komponierten Enzyms schließen.

Tabelle III. Verfolgung der enzymatischen Wirksamkeit beim Aufbewahren der Lösungen bei neutraler Reaktion und 30°.

a) Im Falle der vorbehandelten Leberlösung.

b) Im Falle der Mischlösung.

Nr.	Zeit Std.	Angewandte Enzymmenge ccm	Wirksamkeit E. E.
1a	0	2	1,36
b	15	2	1,32
2a	0	5	3,00
b	15	5	2,95
3a	0	5	2,75
b	15	5	2,73
4a	0	5	2,00
b	3	5	2,00
c	4	5	2,00
d	20	5	1,89

Nr.	Zeit Std.	Angewandte Enzymmenge ccm	Wirksamkeit E. E.
1a	0	2	0,73
b	15	2	0,73
2a	0	5	1,70
b	15	5	1,43
c	24	5	1,32
3a	0	5	2,05
b	24	5	1,95
4a	0	5	1,25
b	1	5	1,14
c	3	5	1,02
d	4	5	1,02
e	20	5	1,02

b) *Der Quotient* $\frac{\text{Tributyrynspaltung}}{\text{Methylbutyratspaltung}}$. Als Beweis für die angenommene Synthese von Leberesterasesymplex aus Pankreas-Agon

und Leber-Pheron betrachten *Kraut* und *v. Pantschenko-Jurewicz* die in den Mischlösungen zu beobachtende Änderung in der Substratspezifität. Das Verhältnis von Butyraseeinheiten (B. E.) zu Esteraseeinheiten (E. E.) wird in der Mischlösung nicht so gefunden, wie es sich auf Grund der Messungen an den Komponenten errechnet, sondern ergibt geringere Werte, insbesondere, wenn man die Messungen unter Zusatz der „Ausgleichsaktivatoren“ zugrunde legt; die Mischlösungen zeigen sich also weniger geeignet für die Spaltung von Tributyrin, dagegen besser befähigt für die Spaltung von Buttersäuremethylester. Einige Versuche in dieser Richtung haben auch diese Befunde bestätigt (Tab. IV). Doch brauchen sie nach unserer Meinung nicht unbedingt im Sinne einer Neubildung von Esterase und einer teilweisen Umwandlung der noch vorhandenen Pankreaslipase ausgelegt zu werden. Die Kompliziertheit der Systeme, wie wir sie in unserer Untersuchung über pankreatische Lyo- und Desmolipasen kennengelernt haben (vgl. besonders die Beispiele der Tabelle VIII jener Abhandlung), erlauben kaum eine so eindeutige Auslegung.

c) *Die stereochemische Spezifität.* Die Untersuchung der Konfigurationsspezifität führten wir mit Hilfe des Mandelsäureäthylesters durch. Dieses Substrat hatte uns bei den reaktionskinetischen Messungen früherer Arbeiten gedient.

Das einheitliche Ergebnis aller Versuche ist, daß die Esterase der Mischlösungen, in denen sich Esteraseneubildung vollzogen hat, ein anderes optisches Auswählen zeigt als die natürliche Leberesterase (Tabelle V). Es ist ein glücklicher Umstand, daß für den Vergleich von den beiden Komponenten der Mischlösung nur die eine, nämlich die vorgereinigte Leberesteraselösung, zu berücksichtigen ist; denn in den in Betracht kommenden Versuchszeiten wird von dem in den verdünnten Pankreaslösungen enthaltenen Enzym ein meßbarer Umsatz des Substrats nicht bewirkt (Tabelle VI). Eine Komplizierung tritt auch dadurch nicht auf, daß die Mischlösungen Glycerin enthalten (durch den Zusatz der Pankreasglycerinauszüge). Glycerin mindert wohl den Umsatz etwas herab, zeigt jedoch keinen Einfluß auf das optische Auswählen selbst (Tabelle VII).

Es wäre naheliegend, die Änderung im optischen Auswählen mit der Anwesenheit von Substanzen der Pankreasauszüge in Zusammenhang zu bringen. Diese Annahme muß jedoch deshalb ausscheiden, weil Mischlösungen, deren eine Komponente *Rohlösungen* entweder aus Pankreas oder aus Leber waren, kein verändertes Verhalten gegenüber der Vergleichslösung zeigten (Tabelle VIII). Die Änderungen konnten wir nur in solchen Mischlösungen beobachten, in denen ein deutlicher Zuwachs an methylbutyratspaltendem Enzym festzustellen war, in denen also ein besonderer Vorgang, nach *Kraut* und *v. Pantschenko-*

Tabelle IV. Wirkungsverhältnis gegenüber verschiedenen Substraten. (A. = Zusatz der „Ausgleichungsaktivatoren“. Die Wirkung gegen Methylbutyrat (E.E.) wurde immer ohne A. gemessen. Die Zahlen in Klammern sind Annäherungswerte.)

Agon		Pheron				Mischungen von Agon und Pheron (25 ccm verdünnter Pankreassaft + 25 ccm vorbehandelte Leberlösung)								
E. E. in 5 ccm	B. E. in 1 ccm		B. E. in 1 ccm		E. E. in 10 ccm	Zuwachs an E. E. %	B. E. in 2 ccm		Abnahme an B. E. %		berechnet		gefunden	
	ohne A.	mit A.	ohne A.	mit A.			ohne A.	mit A.	B. E. ohne A. E. E.	B. E. mit A. E. E.	B. E. ohne A. E. E.	B. E. mit A. E. E.	B. E. ohne A. E. E.	B. E. mit A. E. E.
0,05	6,00	120	1,36	0,80	1,99	35,5	6,00	100	17,2	(24,0)	15,6	262		
0,00	4,60	72	2,00	1,65	2,18	8,8	6,54	60	18,6	(15,6)	14,9	138		

Tabelle V. Vergleich der Spaltung von racemischem Mandelsäureäthylester durch die Esterase der Mischlösungen und der vorgeeinigten Leberlösungen. (Der Versuchsansatz von 50 ccm enthält 2 g Phosphatpuffer $pH = 7$, 0,25 g racemischen Mandelsäureäthylester und jeweils die gleiche Zahl von E. E. in den Vergleichsversuchen. $t = 30^\circ$).

Nr.	Enzymmenge E. E.	Versuchszeit Std.	Vorbehandelte Leberlösung			Mischlösung aus 25 ccm vorbehandelter Leberlösung + 25 ccm verdünntem Pankreassaft			Zuwachs an methylbutyrat- spaltendem Enzym %
			Spaltung %	Drehung der isolierten Mandelsäure (10 ccm, $t = 2$ dm)	$[\alpha]_D^{18}$ der Mandelsäure	Spaltung %	Drehung der isolierten Mandelsäure (10 ccm, $t = 2$ dm)	$[\alpha]_D^{18}$ der Mandelsäure	
1	4,6	15	46,5	+ 1,63°	+ 83,5°	+ 81,0°	+ 1,49°	43,5	13,2
2	4,6	15	47,8	+ 1,65	+ 82,0	+ 80,0	+ 1,54	45,7	13,6
3 a	4,6	3	9,0	+ 0,36	+ 95,0	+ 84,5	+ 0,30	8,4	6,5
b	4,6	15	46,2	+ 1,61	+ 82,5	+ 81,8	+ 1,49	43,2	6,5
4	4,6	3	8,0	+ 0,32	+ 95,0	+ 78,0	+ 0,26	7,9	14,6
5 a	4,6	3	8,7	+ 0,34	+ 93,5	+ 87,5	+ 0,30	8,1	8,7
b	4,6	6	17,4	+ 0,66	+ 90,0	+ 82,5	+ 0,60	17,2	8,7
6 a	2,3	3	4,1	+ 0,15	+ 86,0	+ 69,0	+ 0,11	3,8	22,2
b	2,3	6	8,0	+ 0,27	+ 79,5	+ 67,5	+ 0,22	7,8	22,2
7 ¹	5,0	4	10,6	+ 0,41	+ 93,0	+ 82,0	+ 0,36	10,4	12,6

¹ Für diesen Versuch diente das einheitliche Trockenpräparat.

Jurewicz eben die Neubildung eines Enzymsymplexes, stattgefunden hatte.

So isolierten wir bei einer Racematspaltung, zu der eine Mischlösung Anwendung fand, die einen Zuwachs von 14,6% an methylbutyratspaltendem Enzym aufwies, Mandelsäure von der spezifischen Drehung $+78,0^{\circ}$, während im Vergleichsversuch mit vorbehandelter Leberesteraselösung beim gleichen Spaltungsgrad ein $[\alpha]_D^{18}$ von $+95,0^{\circ}$ für die Mandelsäure ermittelt wurde. *Das Enzym der Mischlösung wählt also weniger spezifisch aus als die Leberesterase.* Diese Beobachtung haben wir bei allen Versuchen, von denen einige in Tabelle V als Belege angeführt sind, gemacht. Dabei stellten wir noch fest, daß die Abweichungen besonders bei niederen Spaltungsgraden in Erscheinung treten, während bei höheren die Unterschiede sich auszugleichen scheinen. (Versuch 3a und b der Tabelle V; vgl. dazu auch die Versuche 1 und 2 dieser Tabelle.) In den meisten Fällen steht ferner der Umsatz an Mandelsäureester in den Versuchen mit Mischlösung etwas zurück gegenüber dem Umsatz in den Vergleichsversuchen mit Leberesterase, obgleich dieselben Enzymmengen, gemessen mit Buttersäuremethylester, Anwendung fanden. Anteil an dieser zweiten Erscheinung hat, wie schon erwähnt, das anwesende Glycerin.

Zu den Versuchen der Racematspaltung durch die Mischlösungen wurden jeweils Parallelversuche mit der betreffenden vorgereinigten Leberlösung ausgeführt (vgl. Tabelle V). Es wäre nicht angängig, das jedem Spaltungsgrad zugehörnde $[\alpha]_D^{18}$ einer Eichkurve zu entnehmen, die mit irgendeiner der vorgereinigten Leberlösungen aufgenommen werden könnte; da nämlich die Leberlösungen die Esterase aus verschiedenen Lebern (Mischpräparat) enthalten, können sich bei den Reinigungsoperationen die Anteile an mehr oder weniger spezifisch auswählendem Enzym ändern. Wir haben in vorausgehenden Abhandlungen dieser Reihe¹ gefunden, daß das optische Auswählen der Esterase eines Organs für eine Tierspezies nur „in engeren Grenzen“ konstant ist.

Tabelle VI. Einwirkung von Pankreasauszügen auf Mandelsäureester.

(Im 50 ccm-Ansatz 40 ccm eines zehnfach verdünnten blanken Pankreasglycerinauszuges; sonst wie die Versuchsansätze der Tabelle V.)

NB. Die kaum meßbare Spaltung wird durch ein Mehrfaches (Vier- bis Sechsfaches) an Pankreaslösung bewirkt, wie es bei den Versuchen mit Mischlösung in Tabelle V angewandt wurde.

Nr.	Versuchszeit Std.	Spaltung %	Drehung der iso- lierten Mandelsäure	$[\alpha]_D^{18}$ der Mandelsäure
1	3	0,68	—	—
2a	3	0,61	—	—
b	6	1,20	—	—

¹ Siehe z. B. VIII. Mitteilung, S. 143 u. 144.

Tabelle VII. Vergleich der Racematspaltung durch Leberesterase in Ansätzen mit und ohne Glycerinzusatz.
(Ansatz wie bei den Versuchen der Tabelle V.)

Nr.	Versuchsdauer Std.	Zusatz	Spaltung %	Drehung der isolierten Mandelsäure	$[\alpha]_D^{18}$ der Mandelsäure
1 a	2	—	9,9	+ 0,38 ⁰	+ 91,0 ⁰
b	4	—	19,8	+ 0,76	+ 91,5
c	6	—	30,0	+ 1,13	+ 87,5
d	8	—	40,0	+ 1,44	+ 85,0
2 a	2	} 8 ccm 85 %iges Glycerin	9,2	+ 0,35	+ 91,5
b	4		18,7	+ 0,72	+ 91,5
c	6		28,0	+ 1,08	+ 91,5
d	8		36,2	+ 1,35	+ 88,0

Tabelle VIII. Mischungen aus Rohlösungen zeigen hinsichtlich des optischen Auswählens keine Unterschiede gegenüber Leberesteraselösungen.

(Ansätze wie bei den Versuchen der Tabelle V.)

Nr.	Enzym- menge	Ver- suchs- dauer	Ammoniakalischer Roh- auszug aus Schweineleber			Mischversuch aus 25 ccm Rohauszug aus Leber + 25 ccm verdünntem Pankreasglycerinauszug			
			Spal- tung	Drehung der iso- lierten Mandel- säure	$[\alpha]_D^{18}$ der Mandel- säure	$[\alpha]_D^{18}$ der Mandel- säure	Drehung der iso- lierten Mandel- säure	Spal- tung	Zu- wachs an methyl- butyrat- spal- tendem Enzym
1	15,0	3	32,3	+ 1,22 ⁰	+ 89,0 ⁰	+ 91,0 ⁰	+ 1,12 ⁰	29,1	0
2 a	7,5	3	13,8	+ 0,53	+ 91,0	+ 91,0	+ 0,53	13,8	0
b	7,5	6	28,1	+ 1,08	+ 90,5	+ 90,5	+ 1,08	28,0	0

Autokatalytischer Anstieg der Umsatzgeschwindigkeit bei der Esterspaltung durch Pankreaslipase und seine Ursache.

VII. Mitteilung¹:

Zur Kinetik der Esterhydrolyse durch Enzyme.

Von

Eugen Bamann und Charlotte Feichtner.

(Aus der Pharmazeutischen Abteilung des Chemischen Laboratoriums der
Universität Tübingen.)

(Eingegangen am 31. August 1936.)

Wir haben beobachtet, daß im Falle der Pankreaslipase die Spaltungsgeschwindigkeit einfacher Ester mit einem *autokatalytischen Habitus* zeitlich zunimmt. Auf diese Erscheinung wurde, soviel uns bekannt ist, in Untersuchungen über dieses Enzym noch niemals aufmerksam gemacht.

Es ist von prinzipieller Bedeutung, ob die Erscheinung ihren Grund hat in Vorgängen, die sich vornehmlich auf das *Substrat*, nämlich Änderung der Konzentration und Entstehung von Spaltprodukten, oder nur auf das *Enzym* beziehen. Ein Beispiel des ersten Falles ist in der I. Mitteilung dieser Reihe² behandelt; die Erscheinung kann aber bei geeigneten Verhältnissen auch dort auftreten, wo, wie z. B. bei der Maltase³, die Wirksamkeit des Enzyms im Laufe der Zeit eine Zunahme erfährt. *Auf ein solches Ansteigen der enzymatischen Wirksamkeit ist nun im Falle der Pankreaslipase die Zunahme der Umsatzgeschwindigkeit zurückzuführen.* Wenn man Pankreaslösungen unter geeigneten Bedingungen aufbewahrt, kann man den Gang in der Aktivität der Lösungen verfolgen: Der Abnahme geht ein Anwachsen der Aktivität voraus. Üblicherweise wird von den beiden Erscheinungen nur die Abnahme zu beobachten sein; für die Erkennung der Aktivitätssteigerung sind die Temperatur bei der Aufbewahrung und der Verdünnungsgrad der Lösungen von Einfluß.

Wirksamkeitssteigerungen solcher Art sind in der Enzymchemie heute keine unbekannte Erscheinung mehr. Im Falle der Pankreaslipase verdient jedoch der Aktivitätszuwachs im Zusammenhang mit jenen Beobachtungen besondere Beachtung, auf die *H. Kraut* und *W. v. Pantschenko-Jurewicz*⁴ die künstliche Neubildung, die „Synthese“

¹ VI. Mitteilung: *E. Bamann* u. *E. Rendlen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **238**, 133, 1936. — ² *E. Bamann* u. *M. Schmeller*, ebenda **183**, 149, 1929, und zwar S. 161; vgl. dazu: *G. M. Schwab*, *E. Bamann* u. *P. Laeverenz*, ebenda **215**, 121, 1933, und zwar S. 138. — ³ *R. Willstätter* u. *E. Bamann*, ebenda **151**, 242, 1926. — ⁴ Diese Zeitschr. **275**, 114, 1934; siehe dazu: *E. Bamann* u. *Ch. Feichtner*, ebenda **288**, 70, 1936.

von Esterase stützen. Offenbar erfolgt die Zunahme der Wirksamkeit gegenüber „einfachen Estern“ nicht ausschließlich nur beim Hinzubringen von „Leber-Pheron“, sondern kann schon in den Pankreaslösungen allein, nach unseren Beobachtungen bis zu 100 % und weit mehr, vor sich gehen. Unentschieden ist noch, ob sich dabei die Bildung neuer Trägersubstanzen vollzieht, die dann zu Enzymsymplexen mit ausgeprägterer „Esterase“-Spezifität führen oder ob im Sinne der Befunde von *H. Dyckerhoff*, *H. Miebler* und *V. Tadsen*¹ die Entfernung proteinartiger Hemmstoffe die Ursache für die Aktivitätssteigerungen ist.

Beschreibung der Versuche.

I. Autokatalytischer Anstieg.

1. Versuchsreihe.

a) *Enzym*. Neutralisierter, ammoniakalischer Auszug aus Aceton-trockenpräparat vom Menschen (6 g Mischpräparat 2 Stunden bei Zimmertemperatur mit 200 ccm n/40 Ammoniaklösung extrahiert und mit n/20 Essigsäure neutralisiert).

b) *Versuchsansatz*. 100 ccm enthalten 0,10 g induktionsfreien² racemischen Mandelsäureäthylester, 4 g Phosphatpuffer $p_H = 7$, Lipaselösung entsprechend 1,3 E. E., $t = 30^\circ$.

c) *Messungsergebnisse*. Nach 5 Stunden 2,5 mg Mandelsäure entsprechend 3,0 % Spaltung, nach 20 Stunden 13,7 mg Mandelsäure entsprechend 16,2 % Spaltung.

2. Versuchsreihe.

a) *Enzym*. Wie in Versuchsreihe 1 (6 g Mischpräparat 2 Stunden bei Zimmertemperatur mit 100 ccm n/40 Ammoniaklösung extrahiert und mit n/20 Essigsäure neutralisiert).

b) *Versuchsansatz*. 100 ccm enthalten 0,50 g induktionsfreien racemischen Mandelsäureester, 4 g Phosphatpuffer $p_H = 7$, Lipaselösung entsprechend 3,7 E. E., $t = 30^\circ$.

c) *Messungsergebnisse*. Nach 9 Stunden 45,6 mg Mandelsäure entsprechend 10,8 % Spaltung, nach 18 Stunden 114,2 mg Mandelsäure entsprechend 27,0 % Spaltung, nach 36 Stunden 202,0 mg Mandelsäure entsprechend 47,8 % Spaltung.

3. Versuchsreihe.

a) *Enzym*. Glycerinauszug aus Aceton-trockenpräparat vom Schwein (10 g Mischpräparat mit 200 g 85 %igem Glycerin 3 Stunden bei Zimmertemperatur extrahiert, zentrifugiert).

b) *Versuchsansatz*. 100 ccm enthalten 0,50 g induktionsfreien Mandelsäureester, 4 g Phosphatpuffer $p_H = 7$, Lipaselösung entsprechend 4,2 E. E., $t = 30^\circ$.

¹ Diese Zeitschr. 268, 17, 1934. — ² *R. Willstätter, R. Kuhn, O. Lind u. F. Memmen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 167, 303, 1927; *E. Bamann u. M. Schmeller*, ebenda 188, 251, 1930.

c) *Messungsergebnisse.* Nach 24 Stunden 42,6 mg Mandelsäure entsprechend 10,1% Spaltung, nach 48 Stunden 146,0 mg Mandelsäure entsprechend 34,6% Spaltung, nach 72 Stunden 251,8 mg Mandelsäure entsprechend 59,5% Spaltung.

II. Der autokatalytische Anstieg die Folge von Aktivitätssteigerungen.

4. Versuchsreihe.

a) *Enzym.* Wie in Versuchsreihe 1.

b) *Versuchsansatz.* Ansatz zur Bestimmung von E. E.

c) *Messungsergebnisse.* Lösung sofort nach Herstellung (5 ccm) 0,34 E. E., Lösung nach 9stündiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur 0,63 E. E., Lösung nach 24stündiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur 0,52 E. E.

5. Versuchsreihe.

a) *Enzym.* Neutralisierter, ammoniakalischer Auszug aus Aceton-trockenpräparat vom Schwein (6 g Mischpräparat 2 Stunden bei Zimmertemperatur mit 100 ccm n/40 Ammoniaklösung extrahiert und mit n/20 Essigsäure neutralisiert).

b) *Versuchsansatz.* Wie in der 4. Versuchsreihe.

c) *Messungsergebnisse.*

Nr.	Art der Aufbewahrung des Enzyms	Zeit in Std. (seit Herstellung des Auszuges)	Aktivitätsänderungen E. E. pro ccm nach Messungen	
			ohne Zusatz der „Ausgleichungs- aktivatoren“	mit
1a	Lösung 10 Std. bei Zimmertemperatur, dann in Eis aufbewahrt	5	0,91	1,80
b		20	1,02	2,38
c		29	0,91	2,61
d		54	0,80	1,59
2a	Lösung 24 Std. auf Eis, dann bei Zimmertemperatur	sofort	0,45	1,15
b		9	0,45	1,14
c		24	0,57	1,48
d		32	1,48	2,27
e		48	0,91	1,70
3a	Wie bei 2, jedoch Lösung zu Beginn auf das doppelte Volumen verdünnt	sofort	0,25	0,51
b		9	0,26	0,51
c		24	0,43	0,91
d		32	0,37	0,57

III. Verhalten der Lipaselösungen gegenüber Tributyrin¹.

Im Hinblick auf die Versuche und Folgerungen von *Kraut* und *v. Pantschenko-Jurewicz* ist es wichtig zu wissen, ob sich die beobachtete Aktivitätssteigerung nur auf einfache Ester erstreckt, oder ob und in welcher Weise sie sich gegenüber andersartigen Substraten, z. B. Tri-

¹ Siehe dazu: *E. Bamann* u. *P. Laeverenz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 223, 1, 1934.

butyryn oder Olivenöl, bemerkbar macht. Bisher haben wir nur einige orientierende Messungen mit Tributyrin ausgeführt. Danach äußert sich bei diesem Substrat die Aktivitätszunahme entweder gar nicht oder nur bedeutend schwächer.

So zeigte die Lösung, die in Versuchsreihe 5, Versuch 2, angewendet wurde, gegenüber Buttersäuremethylester eine auffallend starke Wirksamkeitserhöhung, gegenüber Tributyrin eine nur geringfügige und diese allein in den Messungen ohne Zusatz der „Ausgleichungsaktivatoren“ (A.).

Wirksamkeit gegenüber Buttersäuremethylester.

Frisch dargestellte Lösungen 0,45 E. E. (ohne A.), 1,15 E. E. (mit A.);
Lösung nach 32 Stunden 1,48 E. E. (ohne A.), 2,27 E. E. (mit A.).

Wirksamkeit gegenüber Tributyrin.

Lösung nach 3 Stunden 280 B. E. (ohne A.), 2700 B. E. (mit A.);
Lösung nach 30 Stunden 360 B. E. (ohne A.), 1500 B. E. (mit A.).

Zur genaueren Charakterisierung wären Messungen in zahlreicheren Zeitintervallen nachzuholen, vor allem um dem Einwand zu begegnen, die Aktivitätssteigerungen liefen für beide Substrate nicht parallel.

Über einen auffallenden Befund bei der gleichzeitigen Einwirkung von Pankreaslipase und Leberesterase (des Menschen) auf einen racemischen Ester.

XI. Mitteilung¹:

Über asymmetrische Esterhydrolyse durch Enzyme.

Wird racemischer Mandelsäureäthylester durch ein *Gemisch* von Pankreaslipase und Leberesterase des Menschen gespalten, so deckt die Analyse einen anderen Reaktionsverlauf und zwar hinsichtlich der Geschwindigkeit und der Zusammensetzung der Reaktionsprodukte auf, als man auf Grund der *getrennten* Versuche erwartet. Zum ersten beobachtet man, daß der *Spaltungsgrad* im Mischversuch stark hinter dem aus den Einzelversuchen berechneten *zurückbleibt*. Und zweitens zeigt sich eine Abweichung von dem erwarteten Wert der *spezifischen Drehung* der isolierten Mandelsäure. Dabei ist das $[\alpha]$ abhängig:

a) von dem *Spaltungsgrad* des Esters: eigentümlicherweise *erhöhen* sich aber die Werte für das $[\alpha]$ mit *steigendem* Spaltungsgrad, während üblicher- und notwendigerweise gerade die umgekehrte Erscheinung, nämlich ein Sinken, beobachtet wird. Für diese Feststellung sei folgendes Beispiel angeführt:

13,2 % Spaltung des Esters: $[\alpha]_D^{18}$ der isolierten Mandelsäure: $-10,8^\circ$,
22,7 % Spaltung des Esters: $[\alpha]_D^{18}$ der isolierten Mandelsäure: $-19,8^\circ$.

b) bei gleichem Spaltungsgrad von der *Zeitdauer*, innerhalb welcher dieser Spaltungsgrad erreicht wird. Auch diese Erscheinung tritt bei einheitlichem Enzym nie auf.

23,1 % Spaltung des Esters, erreicht in 9 Stunden, $[\alpha]_D^{18}$: $-14,4^\circ$,
22,7 % Spaltung des Esters, erreicht in 18 Stunden, $[\alpha]_D^{18}$: $-19,8^\circ$.

Da die Versuche bei einer Racematkonzentration durchgeführt sind, bei der die Spaltung durch *Leberesterase* fast *unspezifisch* erfolgt, d. h. die (+)- und (-)-Komponente fast *gleich rasch* zerlegt wird ($[\alpha]_D^{18} = +6^\circ$), die *Pankreaslipase* jedoch den (-)-Ester bevorzugt, wobei der Wert für das $[\alpha]_D^{18}$ der isolierten Mandelsäure etwa -23° beträgt, bedeuten die obigen Befunde, daß die Wirkung des (-)-aus-

¹ X. Mitteilung: E. Bamann u. Ch. Feichtner, diese Zeitschr. 288, 70, 1936.

wählenden Pankreasenzym umso stärker hervortritt, je höher der Spaltungsgrad und je ausgedehnter die Versuchsdauer ist.

Zur Erklärung dieses Verhaltens ist zunächst einmal die Beobachtung heranzuziehen, daß die lipatische Wirksamkeit des Pankreasenzym gegenüber Mandelsäureester und anderen „einfachen“ Estern eine Zunahme¹ im Laufe der Versuchsdauer zeigen kann. Das Pankreasenzym wird also auch im Mischversuch seine Wirksamkeit erst allmählich vollständig entfalten. Und mit dieser Wirksamkeitszunahme geht auch die bevorzugte Spaltung des (—)-Esters einher. Die Berücksichtigung dieser Tatsache ermöglicht jedoch noch keine quantitative Deutung der Verhältnisse. Die genauere Analyse der Versuchsdaten weist darauf hin, daß durch die Anwesenheit des Pankreasenzym im Verlauf der Spaltung ein hemmender Einfluß auf den Umsatz durch das Leberenzym ausgeübt wird. Man wird zu dieser Feststellung vor allem beim Vergleich der Umsätze in den Einzelversuchen und im Mischversuch geführt. Wie bereits erwähnt, bleibt der Spaltungsgrad im Mischversuch hinter dem aus den getrennten Versuchen berechneten erheblich zurück, wobei gleichzeitig im optischen Auswählen eine starke Annäherung an das Auswählen des reinen Pankreasenzym zu beobachten ist.

Die Ursache für diese vorerst unübersichtlichen Vorgänge im Mischversuch kann in zwei verschiedenen Möglichkeiten zu suchen sein:

1. in einer gegenseitigen Wechselwirkung, in der die Enzyme selbst stehen, und

2. in einer von dem Wechsel der Zusammensetzung des Substrats und dem Auftreten der Spaltprodukte herrührenden Beeinflussung des Reaktionsverlaufs.

Für die Begründung der ersten Möglichkeit könnten die von H. Kraut und W. v. Panschenko-Jurewicz² entwickelten Anschauungen über die Struktur der Esterasen herangezogen werden. Man müßte danach annehmen, daß die Gleichgewichte zwischen Enzymsymplex, Agon und Pheron im Mischversuch beeinflußt werden und man müßte an die Möglichkeit einer Enzymumwandlung³ denken. Gegen die Bildung eines neuen Enzym spricht aber u. a. die Beobachtung, daß wesentliche Veränderungen (z. B. im optischen Auswählen) erst im Verlaufe der Spaltung eintreten. Zu Beginn der Versuche kommt die Wirkung

¹ E. Bamann u. Ch. Feichtner, diese Zeitschr. 288, 295, 1936. — ² Ebenda 275, 114, 1934; vgl. dazu E. Bamann u. Ch. Feichtner, ebenda 288, 70, 1936. — ³ Wie wir einer freundlichen Mitteilung des Herrn R. Ammon entnehmen, liegt den Versuchen, die er mit E. Tabor in einer Untersuchung „Vergleich von Menschenpankreas- mit Menschenleberesterase“ (diese Zeitschr. 267, 26, 1933) durchführte, ebenfalls der Gedanke und die Absicht einer eventuellen Umwandlung der beiden Esterasen zugrunde.

des Leberenzym noch stark zum Vorschein, erst später tritt sie gegenüber der Wirkung des Pankreasenzym zurück. Aus diesem Grunde scheidet auch der Gedanke aus, daß die Pankreasauszüge einen das Leberenzym hemmenden Begleitstoff enthalten könnten, der dann im Mischversuch zur Auswirkung gelangen würde. Die Messungen zeigen vielmehr, daß sich der „Hemmstoff“ der Leberesterase im Laufe des Versuchs erst bilden muß. Diese Erkenntnis führt aber dazu, die Deutung in Richtung des zweiten Punktes zu suchen. Auf diesem Wege ist nun in der Tat die Erklärung der Vorgänge möglich: Die scheinbar anomalen Vorgänge im Mischversuch haben ihren Grund in der durch die selektive Spaltung bewirkten Änderung der Zusammensetzung des Racemats und im gleichzeitigen Auftreten der Spaltprodukte. Für die Leberesterase des Menschen, bei der die Vorgänge, die der „optischen Spezifität“ dieses Enzyms zugrunde liegen, bisher am verwickeltesten gefunden wurden, haben wir vor einigen Jahren eine quantitative Analyse der Einzelvorgänge bei der Spaltung von Substratgemischen beschrieben¹. Von den Ergebnissen dieser Arbeit sind nun für den vorliegenden Fall folgende Erkenntnisse wichtig: Der (+)-Ester übt schon in geringen Konzentrationen eine starke Hemmung auf die Spaltung des (-)-Esters aus, obwohl der (-)-Ester an sich die wesentlich größere Affinität zum Enzym besitzt. Diese starke Hemmung, die der (+)-Ester auf die Spaltung des (-)-Esters ausübt, wirkt dahin, daß das stereochemische Auswählungsvermögen der Menschenleberesterase bei der Racematenspaltung einem Gang unterliegt, in dem bei niedriger Racematkonzentration der (-)-Ester, bei höherer der (+)-Ester rascher gespalten wird, während bei einer gewissen mittleren Konzentration der Umsatz beider Antipoden gleich schnell erfolgt. Bei höheren Konzentrationen ist besonders auffallend, daß der optische Sinn der Spaltung [Bevorzugung des (+)-Esters] durch die ganze Spaltung hindurch beibehalten wird, obwohl man erwarten müßte, daß bei Verminderung der Substratkonzentration im Laufe der Durchspaltung die Bevorzugung des (+)-Antipoden in eine Bevorzugung des (-)-Antipoden übergehen, also eine Umkehrung des Auswählens stattfinden würde. Nicht erfüllt wird auch die Erwartung, daß dabei die Geschwindigkeit mit einem autokatalytischen Habitus zeitlich zunimmt. Die Erklärung dafür liegt in der hemmenden Wirkung des bei der Reaktion entstehenden Spaltprodukts Alkohol, der die Spaltung des (-)-Esters in beträchtlicher Weise vermindert und so die Umkehrung des optischen Auswählens und den autokatalytischen Anstieg der Umsatzgeschwindigkeit verhindert.

¹ G. M. Schwab, E. Bamann u. P. Laeverenz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 215, 121. 1933.

Bei Anwendung dieser Erkenntnisse auf die Vorgänge in unseren Mischversuchen wird der starke Abfall der Wirkung des Leberenzym verständlich; er ist auf zwei hemmende Faktoren zurückzuführen, die im Laufe der Spaltung auftreten.

1. Während im Einzelversuch mit Leberenzym wenig raschere Spaltung des (+)-Esters erfolgt und so, wenn auch nur in geringem Maße (—)-Ester zurückbleibt, wird im Mischversuch durch die selektive (—)-Esterspaltung des Pankreasenzym ein Überschuß an (+)-Ester anfallen. Überschüssiger (+)-Ester setzt aber, wie Schwab, Bamann und Laeverenz in der erwähnten Untersuchung an Antipodenmischungen: (— +), (— + +) gezeigt haben, die Reaktionsgeschwindigkeit der Leberesterase stark herab.

2. Außer der Menge Alkohol, die durch das Leberenzym abgespalten wird, entsteht auch noch Alkohol durch die Spaltung, die das Pankreasenzym bewirkt.

So wird es verständlich, daß die Spaltungsgrade im Mischversuch nie die Additionen der Umsätze in den Einzelversuchen darstellen können. Und da nur das Leberenzym auf die beiden genannten Einflüsse in ausgeprägtem Maße anspricht, wird sich der Anteil des Leberenzym am Gesamtumsatz mit fortschreitender Spaltung gegenüber dem Anteil des Pankreasenzym verringern.

Zum Schluß fassen wir die Erklärung für die auffallenden Befunde bei der gemeinsamen Einwirkung von Pankreas- und Leberenzym auf den racemischen Ester dahingehend zusammen: Wenn bei gleichem Spaltungsgrad, aber verschiedener Versuchsdauer das Leberenzym bei dem kürzerdauernden Versuch verhältnismäßig stärker zur Wirkung kommt als bei dem längerdauernden Versuch, so ist hierfür die im Laufe des Versuchs auftretende Zunahme der Wirksamkeit des Pankreasenzym verantwortlich zu machen. Wenn aber bei der Durchspaltung im Bereich von 10 bis 25 % eine Änderung des $[\alpha]$ -Wertes von -10° bis -20° einsetzt, so muß hier die Beeinflussung und Hemmung des Leberenzym durch den Wechsel in der Zusammensetzung des Substrats und das Auftreten des Spaltprodukts Alkohol angenommen werden.

Erläuterungen zu der Durchführung der Versuche, Versuchsdaten.

Die Enzymlösungen bestanden aus ammoniakalischen Auszügen aus Aceton-Äthertrockenpräparaten der Organe. Die Lösungen waren mit Essigsäure neutralisiert und wurden in Eis eingebettet unter Toluol aufbewahrt. Die jeweils angewendeten Enzymmengen (ermittelt auf Grund der Wirksamkeit gegenüber Buttersäuremethylester, also E. E.) sind bei den einzelnen Versuchen der nachstehenden Tabelle verzeichnet. Die Analyse der Reaktionsgemische erfolgte nach dem Verfahren der vorhergehenden Untersuchungen dieser Reihe.

Spaltung von racemischem Mandelsäureäthylester durch Pankreaslipase und Leberesterase (des Menschen) in Einzel- und in Mischversuchen.

(Der Versuchsansatz von 100 ccm enthielt 4 g Phosphatpuffer $p_H = 7$, 0,5 g induktionsfreien¹, racemischen Mandelsäureäthylester und die jeweils angegebene Enzymmenge, $t = 30^\circ$.)

Nr.	Enzym	Enzymmenge E. E. in 100 ccm Vers.-Ans.	Reaktions- dauer Std.	Spaltung %	$[\alpha]_D^{18}$ der isolierten Mandelsäure °
Erste Versuchsreihe.					
1 a	Leberesterase . . .	4	9	15,8	+ 6,0
b			18	29,2	+ 6,5
2 a	Pankreaslipase . .	4	9	19,6	- 23,5
b			18	34,4	- 23,1
3 a	Leberesterase . . .	je 2	9	13,2	- 10,8
b	+ Pankreaslipase .		18	22,7	- 19,8
4 a	wie bei Versuch 3	je 4	4 $\frac{1}{2}$	14,0	- 8,5
b			9	23,1	- 14,4
Zweite Versuchsreihe.					
5 a	Leberesterase . . .	2	2 $\frac{1}{4}$	2,0	-
b			9	7,9	+ 6,0
6 a	Pankreaslipase . .	2	2 $\frac{1}{4}$	0,5	-
b			9	9,8	- 24,0
7 a	Leberesterase . . .	je 1	2 $\frac{1}{4}$	1,4	-
b	+ Pankreaslipase .		9	8,1	- 11,7

¹ R. Willstätter, R. Kuhn, O. Lind u. F. Memmen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 167, 303, 1927; E. Barmann u. M. Schmeller, ebenda 188, 251, 1930.

Sonderabdruck
aus „Biochemische Zeitschrift“ 288, 315, 1936,
Verlag von Julius Springer, Berlin W 9.

Zur Kenntnis der stereochemischen Spezifität der menschlichen Pankreaslipase.

XII. Mitteilung:
Über asymmetrische Esterhydrolyse durch Enzyme.

Von
Eugen Bamann und Charlotte Feichtner.

(Aus der Pharmazeutischen Abteilung des Chemischen Laboratoriums der
Universität Tübingen.)

(Eingegangen am 15. September 1936.)

Für die Erklärung eines auffallenden Befundes bei der gleichzeitigen Einwirkung von Pankreaslipase und Leberesterase (des Menschen) auf racemischen Mandelsäureester, den wir in der vorhergehenden Arbeit¹ dieser Untersuchungsreihe beschrieben haben, war die genaue Kenntnis der optischen Spezifität der menschlichen Pankreaslipase notwendig. Voraussetzung war vor allem zu wissen, ob das stereochemische Auswählen dieses Enzyms von der Racematkonzentration unabhängig ist, oder ob es sich, ähnlich wie wir es für die menschliche Leberesterase gefunden haben², mit der Variierung der Substratkonzentration ändert.

Mit dieser Frage befaßt sich schon eine Untersuchung von *R. Ammon* und *E. Tabor*³: Vergleich von Menschenpankreas- mit Menschenleberesterase. Darin stellen die Autoren fest: „Das optische Auswahlvermögen ist unabhängig von der Substratanfangskonzentration.“ Allein aus den angegebenen Versuchsdaten müßte gerade das Gegenteil geschlossen werden. Denn für denselben Pankreasauszug wurde bei dem gleichen Spaltungsgrad des Mandelsäuremethylesters (12,8 %) im Falle einer

0,4 %igen Esterlösung eine spezifische Drehung der isolierten Mandelsäure
von $-37,4^{\circ}$,

1,0 %igen Esterlösung eine spezifische Drehung der isolierten Mandelsäure
von $-45,9^{\circ}$,

2,0 %igen Esterlösung eine spezifische Drehung der isolierten Mandelsäure
von $-50,1^{\circ}$

gefunden. Danach bestünde doch Abhängigkeit von der Substratkonzentration, nur ginge sie nicht bis zur unspezifischen Spaltung oder zur Umkehr des optischen Auswählens, wie es für die Leberesterase

¹ XI. Mitteilung: Diese Zeitschr. 288, 310, 1936. — ² E. Bamann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 62, 1538, 1929; G. M. Schwab, E. Bamann und P. Laeverenz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 15, 121, 1933. — ³ Diese Zeitschr. 267, 28, 1933.

festgestellt wurde. Zu demselben Schluß führen auch die Angaben im Falle des Mandelsäurepropylesters. Hier unterscheiden sich die $[\alpha]$ -Werte ebenfalls um etwa 10^0 (0,4 %ige Esterlösung $[\alpha]_D = -26,2^0$, 2 %ige Esterlösung $[\alpha]_D = -15,9^0$).

Unsere Nachprüfung (am Mandelsäureäthylester) hat entschieden, daß das optische Auswählen der menschlichen Pankreaslipase *unabhängig ist von der anfänglichen Racematkonzentration* und daß außerdem die Werte für die spezifische Drehung der isolierten Mandelsäure bis zu Spaltungsgraden von etwa 50 % kaum sinken. Demnach sind die Vorgänge bei der Racemathydrolyse nicht so verwickelt wie im Falle der Leberesterase des Menschen, und es gehört daher die menschliche Pankreaslipase dem einfacheren der bisher beschriebenen Typen an.

Als Enzymlösung dienten mit n/40 Ammoniak aus einem Sammel-aceton-Äthertrockenpräparat hergestellte Auszüge, die mit Essigsäure neutralisiert und unter Toluol in Eis aufbewahrt wurden. Die Analyse der Spaltungsversuche erfolgte nach den Angaben der vorausgehenden Arbeiten dieser Untersuchungsreihe.

Unabhängigkeit des optischen Auswählens bei der Einwirkung von Pankreaslipase des Menschen auf racemischen Mandelsäureäthylester bei wechselnder Esterkonzentration.

(Der Versuchsansatz von 100 ccm enthält 4 g Phosphatpuffer $p_H = 7$, sowie die jeweils angegebene Ester- und Enzymmenge, $t = 30^0$.)

Nr.	Substrat-konzentration g/100 ccm	Enzym-menge E. E.	Reaktions-dauer Std.	Spaltung %	Drehungswinkel der Mandelsäure (10 ccm, 1 = 2 dm)	$[\alpha]_D^{18}$ der isolierten Mandelsäure
1 a	0,1	1,3	5	3,0	-0,03 ⁰	-23,8 ⁰
1 b			20	16,2	-0,17	-24,8
2	0,1	2,5	6	4,9	-0,05	-24,1
3	0,5	2,5	18	26,2	-0,25	-22,6
4 a			9	10,8	-0,11	-24,1
4 b	0,5	2,5	18	27,0	-0,27	-23,6
4 c			36	47,8	-0,43	-21,3
5	1,0	2,5	22 ¹ / ₃	19,9	-0,40	-23,9
6	1,0	2,5	29 ³ / ₄	29,1	-0,58	-23,6
7	1,5	2,5	30	18,4	-0,56	-24,0
8 a	1,5	2,5	21 ³ / ₄	16,3	-0,49	-23,8
8 b			43 ³ / ₄	32,7	-0,99	-23,8

Lebenslauf.

Am 1. Juni 1911 wurde ich in Karlsruhe in Baden als Tochter des Prokuristen Joseph Feichtner und seiner Ehefrau Hilda, geb. Bosch, geboren. Ich besuchte die vier Vorklassen und die erste Klasse der Höheren Mädchenschule in Karlsruhe, von 1922 — 1927 die Mädchenschule und Realschulabteilung der Lehrfrauen vom Hl. Grab in Baden-Baden und — nach Ablegung der Aufnahmeprüfung für Obersekunda — von 1927 — 1930 die Fichte-Oberrealschule in Karlsruhe. Nach bestandener Reifeprüfung an dieser Oberrealschule, Ostern 1930, studierte ich vom Sommersemester 1930 an ununterbrochen an der Technischen Hochschule Stuttgart Chemie und bestand im Februar 1935 an dieser die Diplom-Hauptprüfung für Chemiker. Im April 1935 begann ich im Laboratorium für organische und pharmazeutische Chemie der Technischen Hochschule Stuttgart bei Herrn Professor Dr. E. Bamann mit meiner Doktorarbeit, die ich nach Berufung des genannten Herrn an die Universität Tübingen daselbst Ende des Sommersemesters 1936 abschloß.