Über Malzdiastase und die Einwirkung von Kaliumphosphaten auf dieselbe;

von

Rutger C:son Heyl.

(Mit einer Figur im Texte und 12 Tabellen.)

In Anbetracht, daß Diastase und ihre verzuckernden Wirkungen seit nahezu 100 Jahren oder genauer bestimmt seit 1814¹⁾ bekannt sind, und daß die Diastase eins der technisch wichtigsten Enzyme ist, sollte man annehmen, daß diese Enzyme und ihre Wirkungen so gut bekannt sein müßten, daß ein weiteres Forschen auf diesem Gebiete wenig lohnend wäre. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein. Es gab kaum während der letzten Jahre auf wenigen Gebieten so viele neue Anregungen, wie gerade auf diesem, und ein solches verhältnismäßig neues Problem, welches ein dankbares Feld für neue Forschungen bietet, ist: die Untersuchung der fördernden oder hemmenden Einflüsse anderer chemischer Verbindungen auf die verzuckernden Wirkungen der Diastase.

Daß anorganische Verbindungen und besonders die Alkaliphosphate einen großen Einfluß auf die hydrolysierenden Wirkungen der Diastase haben, ist allgemein bekannt. Aber bei dem Studium der Literatur über dieses Gebiet findet man eine Menge einander, wenigstens scheinbar, widersprechender Angaben über die Art dieses Einflusses. Der Grund zu diesen strittigen Mitteilungen dürfte unter anderem im Mangel genaueren Studiums des Reaktionsverlaufes und vor allem in den Schwierigkeiten, Arbeitsmethoden für ein solches Studium zu finden, liegen. Bedenkt man außerdem, daß die meisten Forscher bei ihren Arbeiten nicht ausreichend genaue Versuchsbedingungen und Arbeitsmethoden angeben, so sind, in Anbetracht der großen Empfindlichkeit der Diastase gegen äußere Einflüsse, ziemlich viele Verschiedenartigkeiten bei den erhaltenen Resultaten auch erklärlich. — Aber die Angaben

¹⁾ Kirchhoff, Schweig. Journ., Bd. XIV, S. 389.

weichen von einander so sehr ab, daß es wohl wert ist, eine eingehende Untersuchung vorzunehmen, um so mehr als in den letzten Jahren große Fortschritte in Hinsicht auf die Arbeitsmethoden gemacht worden sind, und man infolgedessen teilweise neue Resultate erwarten kann. Auf Anregung des Herrn Prof. H. von Euler habe ich deshalb, um die Einwirkungen der Kaliumphosphate auf die verzuckernde Wirkung der Malzdiastase zu ermitteln, einige Versuche angestellt.

Daß Alkali und basisches Alkaliphosphat die Wirkungen der Diastase hemmen, darüber scheinen sich sämtliche Forscher einig zu sein. Bereits 1880 haben Chittenden und Ely in einer Abhandlung: „*Influence of Peptones and certain inorganic salts on the diastatic action of saliva*“ gezeigt, daß zweibasisches Natriumphosphat auf die Diastase hemmend wirkt. J. R. Duggen und R. W. Wood geben gleichfalls an¹⁾, daß die Wirkung der Diastase durch Spuren Alkali gehemmt wird, aber daß kleine Mengen Säure fördernd wirken. In Hinsicht auf Säuren, neutrale und saure Salze sind die Meinungen geteilt.

Nach Effronts Untersuchungen in den Jahren 1892 bis 1895²⁾ „*Sur les conditions chimiques de l'action des diastases*“³⁾, welche als grundlegend auf diesem Gebiete betrachtet werden dürfen, sollen die Wirkungen der Diastase wesentlich von Veränderungen des Mediums, in welchem sie wirkt, beeinflußt werden. Effront hat gefunden, daß das Verzuckerungsvermögen der Malzdiastase durch Zusatz von kleinen Mengen Mineralsäuren erhöht wird. Dies scheint jedoch zuerst von Baranetzsky⁴⁾ gezeigt worden zu sein. Weiter hat Effront gefunden, daß größere Mengen neutraler Salze, z. B. Kochsalz, dieselben Wirkungen haben und daß Phosphorsäureverbindungen ein besonderes Vermögen besitzen, die Diastasewirkungen zu fördern. Ein anderer Forscher auf diesem Gebiete, John S. Ford⁵⁾, meint, daß eine Spur von saurem Phosphat (MH_2PO_4) nicht wesentlich fördernd, dagegen alkalisches Phosphat (M_2HPO_4) hemmend wirkt. In größeren

¹⁾ Amer. Chem. Journ. 7, 306; 8, 211; 15, 663.

²⁾ Compt. rend. 115, 1324.

³⁾ Compt. rend. 119, 169; 120, 1281.

⁴⁾ Die stärkeumbildenden Fermente. 1878.

⁵⁾ Wochenschr. f. Brauerei 1904, S. 527; Chem. Centr. 1906, I, S. 314.

Mengen dagegen soll saures Phosphat die Verzuckerung befördern, aber dies soll auf indirekten Wirkungen beruhen. Weiter sollen nach Ford kleine Spuren von Alkali und Säuren schädlich auf Diastase wirken, und dies um so mehr, je reiner die Stärke ist. Die diastatischen Wirkungen erreichen nach Ford folglich ihr Maximum in neutraler Lösung. W. Schneidwind, D. Meyer und F. Münter¹⁾ haben im Gegensatz zu Ford gefunden, daß kleine Mengen Alkalimonophosphat sehr günstig auf Malzdiastase einwirken. A. Fernbach und J. Wolff²⁾ heben wieder hervor, daß die Hydrolyse durch Na_2HPO_4 verzögert, durch NaH_2PO_4 beschleunigt wird, doch nur unter der Voraussetzung, daß große Mengen dieses Salzes hinzugesetzt werden. H. Roger³⁾ hat gefunden, daß, wenn man zum menschlichen Speichel steigende Mengen Uranacetat hinzusetzt, die Verzuckerung zurückgeht, um vollständig aufzuhören, wenn sämtliche Phosphate ausgefällt sind. Setzt man Natriumphosphat hinzu, so kehrt das Verzuckerungsvermögen zurück, und es scheint folglich, als ob die Wirkungen der Diastase (*in saliva*) nur stattfinden können, wenn Phosphate dabei sind. Nach einer neueren Untersuchung von Speicheldiastase von Bang⁴⁾ können Phosphate sowohl aktivieren als inaktivieren.

Die Phosphatwirkungen auf das Verzuckerungsvermögen der Diastase können am geeignetsten durch Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten ermittelt werden. Durch ein derartiges Verfahren erhält man nämlich ein bestimmtes, in Ziffern ausdrückbares Maß für die hemmenden oder fördernden Wirkungen der Phosphate. Es war deshalb wichtig, für die vorliegende Untersuchung eine Arbeitsmethode zu finden, welche mit großer Empfindlichkeit für auch kleine Veränderungen der Reaktionsgeschwindigkeiten auch so bequem und leicht war, daß alle Versuche durch Parallelproben geprüft werden konnten.

Es gibt bei der Wahl der Methode drei ungleiche Grundtypen: Viskositätsbestimmungen, kolorimetrische Messungen

¹⁾ Chem. Centr. 1907, I A, 743.

²⁾ Compt. rend. 143, 363 u. 380; 145, 261.

³⁾ Wochenschrift für Brauerei 1909, S. 39.

⁴⁾ Biochem. Zeitschr. 32, 417 (1911).

und Bestimmung des Reduktionsvermögens. Die Viskositätsmethode konnte ihrer Unzuverlässigkeit und Unempfindlichkeit wegen nicht angewandt werden. Um die vorbereitenden Untersuchungen zu machen, habe ich mich Wohlgemuths kolorimetrischer Jodjodkaliummethode¹⁾ bedient, während für die genaueren Versuche Bertrands Zuckerreduktionsmethode benutzt wurde.²⁾

Das Prinzip der Wohlgemuthschen Methode ist, wie bekannt, daß man aus der sich in der Verzuckerung befindenden Lösung eine Probe herausnimmt, einen Tropfen Jodjodkaliumlösung hinzusetzt und die Farbe beobachtet, die durch die Färbung der Dextrine und der Stärke durch Jod in der Probe entsteht. Durch Beobachtung der Zeit, die seit dem Beginne der Verzuckerung verfließt, bis daß man eine gewisse willkürlich bestimmte Farbe erhält, bekommt man also ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit. Diese Methode wurde auf folgende Weise angewandt:

In Erlenmeyerkolben von 50 ccm ließ ich 30 ccm destillierten Wassers aus einer Pipette ab, und darnach wurden die Kolben in eine Kältemischung gebracht. Von Zeit zu Zeit wurde eine 10 ccm große Probe mittels Pipette aus der Lösung, deren Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt werden sollte, herausgenommen und so schnell wie möglich in einen der so vorbereiteten Kolben abgelassen, worauf ich einen Tropfen von $\frac{1}{10}$ n-Jodjodkaliumlösung hinzusetzte. Weil die Färbung unzweifelhaft in hohem Grade von der Größe eines so hinzugesetzten Tropfens abhängig ist, wurde, um eine konstante Größe zu erhalten, in solcher Weise verfahren, daß ich von der Jodjodkaliumlösung, welche sich in einer Bürette befand, und in dieser auf konstantem Niveau durch häufiges Nachfüllen gehalten wurde, 4 Tropfen abfließen ließ, worauf der fünfte angewendet wurde. Eine große Schwierigkeit bei dieser Methode ist, daß, weil die von Jod entstandene Farbe nach einigen Minuten verschwindet, zwischen den Farben der verschiedenen Proben keine Vergleiche gemacht werden können. Man muß also, wenn möglich, es so abpassen, daß man eine gewisse willkürlich gewählte Farbe erhält. Da man, um ein gutes Resultat zu erhalten, diese Farbe kurz bevor vollständige

¹⁾ Biochem. Ztschr. 9, 1 (1908). ²⁾ Bull. Soc. Chim. 35, 1285 (1906).

Rotfärbung eintritt, wählen muß, d. h. eine rotviolette Farbe, so ist es schwer, eine Standardprobe zum Vergleichen zu erhalten. Mir glückte es indessen, durch Anwendung einer konzentrierten Lackmuslösung, zu welcher eine Spur verdünnter Schwefelsäure gesetzt war, einen voll anwendbaren Standard zu erhalten. — Diese Methode erwies sich indessen bei genaueren Bestimmungen der Reaktionsgeschwindigkeit als unbrauchbar.

Wie oben angegeben, wandte ich für die genaueren Versuche Bertrands Zuckerreduktionsmethode an, und zwar auf folgende Weise: Im Erlenmeyerkolben von 200 ccm Inhalt wurden 20 ccm von Bertrands A-Lösung mit 20 ccm B-Lösung und 10 ccm destilliertem Wasser gemischt. Alle fünf oder zehn Minuten wurden mittels der Pipette 10 ccm der Stärkelösung, deren Verzuckerungsgeschwindigkeit untersucht werden sollte, herausgenommen und in einen der oben genannten Kolben abgelassen. Weil es wichtig war, gleichzeitig so viele Versuche wie möglich anzustellen, — dies, um durch Benutzung derselben Diastaselösung bei den getrennten Versuchen gleiche Enzymkonzentration zu erhalten, — so konnten die herausgenommenen Proben nicht sofort weiter behandelt werden. Es kam also darauf an, mit vollständiger Sicherheit den Fortgang der Reaktion in den Proben zu verhindern, und dies wurde gerade dadurch erreicht, daß sie auf obengenannte Art direkt aus der Pipette in die Fehlingsche Lösung abgelassen wurden. Ich versuchte anfangs, bevor ich mich der soeben angegebenen Methode bediente, durch Zusatz von Alkali zu den Proben die Diastase zu inaktivieren und so die Reaktion abubrechen. Es zeigte sich indessen, daß Verharzung eintrat und das Reaktionsvermögen der Lösung herabgesetzt wurde. Da man vermuten konnte, daß Verharzung auch durch Zusatz der Fehlingschen Lösung eintreten könnte, so stellte ich, teils um dies zu untersuchen, teils um die Einwirkung des Alkalis auf das Reduktionsvermögen der verzuckernden Stärkelösungen zu ermitteln, eine Anzahl Versuche an und führe von diesen folgende an:

Aus einer Maltoselösung, von der 10 ccm nach Bertrands Methode 65,6 mg Maltose enthielten, wurden 10 ccm herausgenommen und 14 Stunden lang mit 20 ccm Bertrandscher

B-Lösung und 10 ccm Wasser stehen gelassen. Nach dieser Zeit wurde Kupfersulfatlösung hinzugesetzt und das Reduktionsvermögen untersucht. Dies zeigte sich nun als nur 49,4 mg Maltose entsprechend, d. h. das Reduktionsvermögen war um 24,5⁰/₀ vermindert worden.

Eine Stärke-Maltoselösung ergab bzw. 46,2 und 37,5 mg nach 14 Stunden, entsprechend einer Verminderung von 18,9⁰/₀. Das Reduktionsvermögen ist auch hier in Maltose ausgedrückt.

Ließ man dagegen die respektiven Lösungen gleich lange Zeit mit A- und B-Lösungen stehen, so wurde während dessen ein Teil Kupferoxydul ausreduziert, aber das ganze Reduktionsvermögen blieb das gleiche, wie bei sofortiger Reduktion. (In obengenanntem Falle also respektive 65,6 und 46,2 mg.) Eine Verharzung fand nicht in diesem Falle statt. Die Temperatur bei diesem Versuche betrug 17°—18°.

Wenn also die herausgenommenen Proben in Fehling'scher Lösung stehen blieben, so wurde ihr Reduktionsvermögen nicht verändert. Im Durchschnitt haben sie 4—10 Stunden lang gestanden, bevor die Reduktion in Übereinstimmung mit Bertrands Vorschriften ausgeführt wurde; besonders wurden die Kochzeiten (3 Min.) genau beobachtet. Die Konzentrationen der Ferrisulfat- und Kaliumpermanganatlösungen entsprachen Bertrands Anweisungen. Da die von ihm aufgestellten Tabellen leider nur die Beziehungen zwischen Kupfer und Maltose für jedes ganze mg Maltose angeben, so habe ich durch Interpolation in diesen Tabellen die jedem 0,05 ccm der Kaliumpermanganatlösung entsprechenden Werte berechnet.

Enzym.

Als Material für die Enzymlösungen wurde ein helles Pilsener Malz angewandt, das aus sogenannter zweizeiliger Gerste (aus Schonen) hergestellt war. Dieses Malz wurde zu feinem Mehl gemahlen, wovon 50 g mit 500 ccm destillierten, vollständig gegen Lackmus neutral reagierenden Wassers gemischt und genau eine Stunde lang bei ca. 17° unter wiederholtem Schütteln stehen gelassen wurden. Nach dieser Zeit wurde das Malzschrot durch dünnes, gut gewaschenes Baumwollenzeug abfiltriert. Die Lösung wurde darauf bis zur vollständigen Klarheit filtriert und entweder verdünnt oder unver-

dünnt angewandt, was für jeden besonderen Fall angegeben ist. Die Enzymlösungen reagierten sehr schwach sauer gegen Lackmus. In den meisten Fällen waren 0,2 ccm $\frac{1}{10}$ n-Natronlauge ausreichend, um 100 ccm Diastaselösung zu neutralisieren. Gleichfalls ergaben die Enzymlösungen nach dem Ansäuern mit Salpetersäure keinen Niederschlag oder Opalisierung mit Silbernitrat, selbst nicht nach Kochen mit verdünnter Salpetersäure.

Substrat.

Für die Stärkelösungen wurde „lösliche Stärke“ angewandt, die neutral gegen Lackmus reagierte und gelöst nicht Fehlingsche Lösung reduzierte. Die Lösungen wurden auf folgende Art hergestellt: 10 g Stärke wurden in 50 ccm destillierten Wassers aufgeschlemmt und in kleinen Portionen in einen Kolben, enthaltend 900 ccm kochenden Wassers, gegossen und darauf mit 50 ccm Wasser nachgespült, während das Kochen die ganze Zeit über langsam vor sich ging. Sobald der Inhalt des Kolbens klar wurde, wurde abgekühlt und der Inhalt filtriert, worauf die Lösung 24 Stunden lang stehen blieb und dann wiederum filtriert wurde. Vor der Benutzung der so bereiteten Lösung wurde sie aufgekocht und abgekühlt.

In jedem Versuche wurden 200 ccm Stärkelösung angewandt und zu jeder Serie wurde dieselbe Lösung benutzt, damit die Konzentration der Stärke in den verschiedenen Versuchen die gleiche war.

Saures Phosphat. Als Phosphatzusatz wurde umkristallisiertes Kaliummonophosphat verwandt, das zu feinem Pulver zerrieben und in einem Trockenschranke bei 60° 6 Stunden lang getrocknet worden war. Es wurde in Lösungen von 200 g pro 1000 ccm Wasser angewandt.

Neutrales Phosphat. Zur Bereitung neutraler Phosphatlösungen wurden gleichfalls 200 g des obengenannten Kaliummonophosphatpulvers benutzt und dabei folgendermaßen verfahren: In einem Maßkolben von 1 l Inhalt wurden 195 g in ca. 750 ccm Wasser gelöst, und darauf wurde mit Kaliumhydroxydlösung (Phenolphthalein als Indikator) bis zur Rotfärbung titriert. Hierauf wurden so viel der übrigen 5 g Phosphat hinzugesetzt, daß die rote Färbung verschwand.

Abwechselnd wurde nun Kaliumhydroxyd und Phosphat hinzugesetzt, bis sämtliche 200 g Phosphat gelöst waren, und hier-nach wurde der Kolben bis zur Marke mit Wasser gefüllt. Nach dem letzten Zusatz von Kaliumphosphat wurde keine Kaliumhydroxydlösung hinzugesetzt, weshalb die Lösung farblos blieb, sie reagierte also nicht alkalisch gegen Phenolphthalein.

Die Versuche wurden, wie folgt, angestellt: In Kolben von 300 ccm Inhalt wurden mittels der Pipette 200 ccm Stärkelösung abgelassen, worauf die gewünschte Anzahl ccm Phosphatlösung nebst so vielen ccm Wasser hinzugesetzt wurde, daß das Totalvolumen dieser Mischung für alle Versuche derselben Reihe gleich blieb. Die Kolben wurden hier-nach, wohl verkorkt (mit soeben ausgekochten Korken), in ein Thermostat gestellt, in das auch die fertige Enzymlösung gebracht wurde. Nach 30 Min. wurde in vorher bestimmten Zeiten jedem Kolben Enzymlösung mittels der Pipette hinzugeführt. Fünf (zehn) Minuten nach dem Zusatz des Enzyms wurden mittels der Pipette Proben herausgenommen, nachdem die Kolben wohl geschüttelt waren.

Die Konzentration des Enzyms und die Temperatur wurden so gewählt, daß die Reaktionen in beinahe 60 bis 70 Min. beendet waren (um Einwirkung von Bakterien zu verhindern). Gewiß könnte dies auch, und zwar wirkungsvoller, durch Sterilisierung z. B. mit Toluol erreicht werden, aber es war denkbar, daß Toluol, welches gewöhnlich keine Wirkung auf Diastase ausübt, bei Zusatz von Phosphaten eine Wirkung haben konnte.

Alle Versuche sind bei 30° ausgeführt.

Die in den Tabellen angegebenen Werte für das Reduktionsvermögen der Lösungen sind in mg Maltose ausgedrückt. Diese Werte sind für das eigene Reduktionsvermögen der Enzymlösungen korrigiert. Für diese Korrektur ist das Reduktionsvermögen von 10 ccm der unverdünnten Enzymlösungen in der Zeit vor der Beendigung des entsprechenden Versuches zugrunde gelegt worden. Durch Versuche ist nämlich gefunden worden, daß die Enzymlösungen in der Zeit von 30 Min., während der sie sich im Thermostat befanden, ihr Maximalreduktionsvermögen erreichten, und daß dieses 2 bis 3 Stunden lang konstant blieb.

Was die Tabellen betrifft, bemerke ich, daß diese das Resultat einer Versuchsreihe sind, also nicht die Mittelwerte mehrerer Parallelversuche enthalten, denn es erwies sich als vollständig unausführbar, die gleiche Konzentration bei der Herstellung der Enzym- und Stärkelösungen zu erhalten. Alle Versuchsreihen sind jedoch dreimal ausgeführt worden, und die Beziehungen zwischen den Versuchen in den verschiedenen Reihen zeigten gute Übereinstimmung.

Die Spaltungskurve.

Es war natürlich von größter Wichtigkeit, größte Sicherheit darüber zu erhalten, ob die Spaltungskurve durch die einfache logarithmische Formel

$$K = \frac{1}{t} \text{Log} \frac{a}{a-x} \quad (1)$$

dargestellt wird, oder ob es nicht der Fall war, einen mathematischen Ausdruck dafür zu erhalten. Die verschiedenen Forscher sind nämlich in dieser Hinsicht zu ganz verschiedenen Ergebnissen gekommen. Brown und Glendinning¹⁾ haben durch Versuche mit Malzdiastase gefunden, daß die Spaltung nicht nach obiger einfachen Formel 1 vor sich geht, sondern besser durch die Formel:

$$K = \frac{1}{t} \text{Log} \frac{a+x}{a-x} \quad (2)$$

ausgedrückt wird.

Nach Henris Versuchen (*Lois générales de l'action des diastases*, Paris 1902) soll dagegen der Stärkeabbau in Übereinstimmung mit der einfachen logarithmischen Formel erfolgen. Diesen beiden Angaben wird jedoch von Ch. Philoche widersprochen.²⁾ Nach diesen folgt die Hydrolyse der Stärke durch Malzdiastase keinem einfachen Gesetze. Im Beginne nimmt die relative Geschwindigkeit ab, bis ungefähr 30% Maltose gebildet sind, dann bleibt sie konstant, bis daß 90—94% Stärke umgewandelt sind. Man kann nicht, sagt Philoche, diesen eigentümlichen Verlauf der Hydrolyse irgend einer Veränderung des Enzyms zuschreiben, denn wenn man die Hydrolyse durch Kochen unterbricht und dann wieder

¹⁾ Journ. Chem. Soc. 81, 388.

²⁾ Journ. Chim. Phys. 6, 355—423.

durch Zufügen von neuen Mengen Diastase in Gang setzt, so wiederholt sich nicht die charakteristische erste Periode.

Alle diese Versuche sind mit Malzdiastase ausgeführt worden, aber bei ungleichen Temperaturen. Was Brown und Glendinning betrifft, haben sie, wie aus Formel 2 hervorgeht, gefunden, daß die Reaktion schneller verläuft, als die einfache logarithmische Formel angibt. Sie haben indessen, wie Philoche schon zeigte, unter solchen Verhältnissen gearbeitet, daß die Reaktion viel schneller verläuft, nämlich bei hoher Temperatur (51° und 52°) und großer Konzentration der Diastase in einer 3prozent. Stärkelösung. Philoche dagegen hat mit äußerst geringer Enzymkonzentration während einer Versuchsdauer von 8—9 Stunden und bei einer Temperatur von $31,5^{\circ}$ in 2prozent. Stärkelösung gearbeitet. Henri arbeitete bei einer Temperatur von 25° .

Henri Van Laer bestätigt dagegen, daß die Spaltung durch die logarithmische Kurve ausgedrückt wird.¹⁾

Ich habe eine rein graphische Methode, um Werte für a zu erhalten, angewandt.

Es erwies sich, daß die Spaltung der Stärke durch Malzdiastase anfangs der einfachen logarithmischen Formel 1 folgt, und dies, als ob nicht die ganze vorhandene Menge Stärke gespalten wird, sondern nur ein Teil davon. Die Reaktion verläuft darnach unendlich langsam.²⁾

Dies geht aus den Tabellen I und II, sowie aus der Figur (S. 444) hervor.

Unter der Bezeichnung B sind in den Tabellen zum Vergleich die nach dem experimentell gefundenen Werte von a berechneten Konstanten angegeben. Die Werte für K sind in diesen Fällen abnehmend, d. h. die Reaktionsgeschwindigkeiten sollen abnehmend sein. Dies ist übereinstimmend mit Philoches Resultaten (a. a. O.) in dem Sinne, daß die Werte der Konstanten abnehmend sind, aber nicht, wie Philoche gefunden hat, bis 30 % Stärke umgewandelt werden; vielmehr habe ich abnehmende Werte in diesem Falle bis zur Um-

¹⁾ Chem. Centr. 1911, I, S. 1687, 1816.

²⁾ Dies muß natürlich als eine Arbeitshypothese aufgefaßt werden, und nicht als unbedingte Feststellung von Tatsachen, besonders da es keinen Beweis dafür gibt, daß die Reaktion unimolekular ist.

Tabelle I.

1 prozent. Stärkelösung. Enzym: 50 cem verdünnt bis 100 cem. Totalvolumen 225 cem, wovon 10 cem Enzymlösung.

A. Die Konstante a ist graphisch 60 mg groß bestimmt

Zeit in Minuten	Reduktions- vermögen ¹⁾	$\frac{x}{a}$	$\text{Log} \frac{a}{a-x}$	$K = \frac{1}{t} \text{Log} \frac{a}{a-x}$
10	27,0	0,45	0,25964	0,025964
20	47,1	0,78	0,66756	0,033378
30	54,0	0,90	1,00000	0,033333
40	57,3	0,95	1,34679	0,033669
50	58,3	0,97	1,54770	0,030954

B. Die Konstante a ist experimentell 73,4 mg groß bestimmt.

10	27,0	0,37	0,19918	0,019918
20	47,1	0,64	0,44574	0,022287
30	54,0	0,74	0,57790	0,019263
40	57,3	0,78	0,65887	0,016471
50	58,3	0,80	0,71648	0,014329

Tabelle II.

Die gleichen Versuchsbedingungen wie in Tabelle I mit Zusatz von von 0,44 mg sauren Kaliumphosphates pro 1 cem der Lösung.

A. Die Konstante a ist graphisch 60 mg groß bestimmt.

Zeit in Minuten	Reduktions- vermögen ¹⁾	$\frac{x}{a}$	$\text{Log} \frac{a}{a-x}$	$K = \frac{1}{t} \text{Log} \frac{a}{a-x}$
10	33,4	0,56	0,35327	0,035327
20	51,7	0,86	0,85907	0,042953
30	56,9	0,95	1,28679	0,042893
40	58,7	0,98	1,66421	0,041605
50	59,2	0,99	1,87506	0,037501

B. Die Konstante a ist experimentell 73,4 mg groß bestimmt.

10	33,4	0,45	0,26364	0,026364
20	51,7	0,70	0,52924	0,026462
30	56,9	0,78	0,64822	0,021607
40	58,7	0,80	0,69838	0,017459
50	59,2	0,81	0,71341	0,014268

¹⁾ in mg Maltose ausgedrückt.

x Mg Maltose

wandlung von 80—85 % erhalten. Dies Verhalten beruht sicher darauf, daß die Versuchsbedingungen ungleiche waren; ich werde in anderem Zusammenhange weiter unten auf diese Frage zurückkommen.

In jedem Falle muß man in Betracht ziehen, daß die erhaltenen Resultate teilweise von der angewandten Arbeitsmethode, Bestimmung der Variation des Reduktionsvermögens, abhängen. Einige Dextrine besitzen ja auch Reduktionsvermögen und verursachen, daß sämtliche Werte im ersten Teile der Reaktion zu groß werden. Aber da man annehmen muß, daß je nachdem Dextrine gebildet werden, andere in gleicher Menge abgebaut werden, so kann dieser methodische Fehler nur eine allgemeine Erhöhung der Reduktionswerte der Kurve verursachen. Nachdem die Kurve dagegen einen gewissen Punkt erreicht hat, also in dem späteren Teile der Reaktion, so verhindert die entstandene Maltose weiteren Stärkeabbau¹⁾, zugleich werden die schon entstandenen Dextrine in Maltose übergeführt und verursachen, daß die Reaktion scheinbar langsamer verläuft, weil nur die Änderung des Reduktionsvermögens der Lösung gemessen werden kann. Mit anderen Worten, wenn eine große Menge reduzierender Dextrine in Maltose übergeführt wird, so zeigen die Beobachtungen nur eine kleine Variation im Reduktionsvermögen der Lösung, welches nur dem Übergange einer kleinen Menge Stärke in Maltose entspricht.

¹⁾ Vgl. A. Wohl u. E. Glimm, Biochem. Ztschr. 27, S. 349—375.

Die Werte für K sind in sämtlichen Tabellen mittels Briggscher Logarithmen ausgerechnet worden.

Die Einwirkung des sauren Kaliumphosphats.

H. Euler und B. af Ugglas¹⁾ haben folgendes gezeigt: Wenn Gerste mit Wasser, das eine Spur Alkaliphosphat enthält, angefeuchtet und dadurch zum Keimen gebracht wird, so ist die diastatische Kraft der aus solcher Gerste hergestellten Diastaselösungen viel größer als die der Enzymlösungen, die ohne Zusatz von Phosphaten hergestellt sind. Ob diese aktivierende Wirkung der Phosphate auf die diastatische Kraft eine Folge der Bildung von einigen Ko-Enzymen oder irgend einer Einwirkung des Phosphates auf die diastatische Spaltung selbst, z. B. durch Bildung von Stärkephosphatkomplexen ist, war nicht festgestellt. Um die Wirkung des sauren Kaliumphosphates zu ermitteln, habe ich die Versuche angestellt, deren Ergebnisse durch die Tabellen III und IV (vgl. auch

Tabelle III.

1 prozent. Stärkelösung. Enzym: 50 ccm verdünnt bis 100 ccm. Totalvolumen 225 ccm, wovon 10 ccm Enzymlösung.

KH ₂ PO ₄ pro cem in mg	0,0		0,44		0,89		1,33		1,78		2,22	
	Rd.- Vm. ²⁾	10 ³ K.	Rd.- Vm. ²⁾	10 ³ K.	Rd.- Vm. ²⁾	10 ³ K.	Rd.- Vm. ²⁾	10 ³ K.	Rd.- Vm. ²⁾	10 ³ K.	Rd.- Vm. ²⁾	10 ³ K.
Zeit in Min.												
10	27,0	26,0	33,4	35,3	34,3	36,8	34,3	36,8	34,3	36,8	35,6	39,1
20	47,1	33,4	51,7	42,9	51,2	41,7	52,1	44,0	51,7	42,9	52,1	44,0
30	54,0	33,3	56,9	42,9	56,6	41,6	56,6	41,6	56,6	41,6	56,6	41,6
40	57,3	33,7	58,7	41,6	58,3	38,7	58,3	38,7	58,7	41,6	58,3	38,7
50	58,3	31,0	59,2	37,5	59,2	37,5	58,3	31,0	59,2	37,5	59,6	43,5
	α = 60		α = 60		α = 60		α = 60		α = 60		α = 60	

die Tabellen V und VI³⁾ veranschaulicht werden. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß saures Phosphat eine doppelte Einwirkung auf den Gang der Hydrolyse hat: Teils wird die

¹⁾ Arkiv för Kemi 3, Nr. 30—34.

²⁾ in mg Maltose ausgedrückt.

³⁾ In den Tabellen ist unter der Rubrik „ KH_2PO_4 in mg pro ccm“ in mg die Menge sauren Kaliumphosphats angegeben, die in jedem ccm der Lösung vorhanden war. Die Bezeichnung „+ KOH“ gibt an, daß

Tabelle IV.

1 prozent. Stärkelösung. Enzym 50 ccm verdünnt bis 100 ccm. Totalvolumen 225 ccm, wovon 10 ccm Enzymlösung.

KH_2PO_4 in mg pro ccm	0,0		0,89		4,44		8,89	
Zeit in Min.	Red.- verm. ¹⁾ 10 ³ K.		Red.- verm. ¹⁾ 10 ³ K.		Red.- verm. ¹⁾ 10 ³ K.		Red.- verm. ¹⁾ 10 ³ K.	
10	27,9	28,5	34,3	36,8	37,0	41,6	36,1	39,9
20	44,9	32,3	51,2	41,7	51,2	41,7	53,6	48,6
30	51,7	32,1	56,6	41,6	56,6	41,6	56,1	37,2
40	54,5	30,5	57,8	35,9	58,3	38,7	58,7	41,6
50	55,6	27,7	58,7	33,3	59,2	37,5	59,6	43,5
	$\alpha = 58$		$\alpha = 60$		$\alpha = 60$		$\alpha = 60$	

Reaktionsgeschwindigkeit im Verhältnis 4:5 erhöht und dies fast unabhängig von der Menge des hinzugesetzten Phosphats teils wird mit steigendem Phosphatgehalt der Teil der Stärke, welche im ersten Teile der Reaktion hydrolysiert wird, vermehrt; d. h. die absolute Menge der entstandenen Maltose wird größer.

Wie schon angegeben (S. 441), hat Philoche gefunden, daß die Reaktionsgeschwindigkeit bis zum Abbau von etwa 30 % Stärke abnimmt, um nachher konstant zu bleiben, während ich nach der von Philoche angewandten Berechnungsmethode abnehmende Geschwindigkeit bis zum Abbau von 80 bis 85 % erhalten habe. Die Erklärung dieser Unterschiede in den Resultaten liegt in den oben gezeigten Verhältnissen. Philoche hat unter solchen Versuchsbedingungen gearbeitet, daß der Teil der Stärke, welcher während des ersten Teiles der Reaktion hydrolysiert wurde, klein war, während diese Stärkemenge in meinen Versuchen groß war. Es ist nämlich klar, daß eine Veränderung der Stärke- und Enzymkonzentrationen bedeutend mehr auf die Menge Maltose, die sich in dem ersten Teile der Reaktion bildet, einwirkt als ein Phosphatzusatz wirken kann. Es geht auch aus den eben angeführten Tabellen hervor, daß die Reaktion bei Phosphatzusatz

das Phosphat auf vorher angegebene Weise neutralisiert war. — Die hinzugesetzte Menge „ PO_4 “ war also unabhängig davon, ob das Salz sauer oder neutral war.

¹⁾ in mg Maltose ausgedrückt.

in Hinsicht auf ihre Gesetzmäßigkeit vollkommen der phosphatfreien Hydrolyse analog ist.

Es ist also unzweifelhaft, daß ein Zusatz von saurem Phosphat die enzymatische Spaltung beschleunigt. Im Verlaufe meiner Versuche zeigte es sich, daß in den verzuckerten Stärkelösungen eine Trübung entstand, und je schneller diese Trübung auftrat, desto größer war die im ersten Teile der Reaktion gebildete Maltosemenge. Bei Phosphatzusatz entstand also diese Trübung schneller, je größer die Phosphatkonzentration war. Ich habe mich durch wiederholte Versuche davon überzeugt, daß diese Trübung nicht bei Phosphatzusatz zu einfacher Stärkelösung entstand. Eine 1prozent. Stärkelösung zeigte sich also nach 24stündiger Einwirkung von 13,33 mg KH_2PO_4 pro ccm vollständig klar. Dagegen erschien diese Trübung, wenn auch in geringerem Grade, ebenfalls in phosphatfreien Enzymstärkelösungen. Diese Trübung stand also in einem bestimmten Zusammenhange mit der Enzymlösung; da es nun fraglich war, ob es die freien H-Ionen waren, die dieselbe durch Koagulieren der in den Enzymlösungen befindlichen Eiweißstoffe verursachten — die Enzymlösungen selbst reagierten, wie schon gesagt, schwach sauer, — so stellte ich die Verzuckerungsversuche in neutralem Medium an.

Die Einwirkungen des neutralen Kaliumphosphats.

Die Enzymlösungen, die bei diesen Versuchen angewandt wurden, wurden mittels Kaliumhydroxydlösung neutralisiert (Lackmus als Indikator). Im übrigen wurden die Versuche auf die gleiche Art wie die mit saurem Phosphate angestellt. Das Resultat ist aus den Tabellen V und VI ersichtlich.

Zum Vergleich stellte ich in jeder Reihe wenigstens einen Versuch mit saurem Phosphate an, und aus ihnen geht hervor, daß die vorausgegangene Neutralisation der Enzymlösungen keinen Einfluß auf den Reaktionsverlauf hatte.

Es zeigte sich bei diesen Versuchen, daß neutrales Phosphat gleich wie saures Phosphat eine doppelte Wirkung auf die Hydrolyse hatte, die teils in einer Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit, teils in einer Verminderung der Stärkemenge, die im ersten Teile der Reaktion hydrolysiert

Tabelle V.

1 Prozent. Stärkelösung. Enzym: 50 cem verdünnt bis 100 cem. Totalvolumen 225 cem, wovon 10 cem Enzymlösung.

KH_2PO_4 in mg pro cem	0,0	0,44	0,44 + KOH	0,89 + KOH	1,33 + KOH	0,44 + KOH + 0,44
Zeit in Min.	Rdver- mögen γ	10^3 K. mögen γ	Rdver- mögen γ	10^3 K. mögen γ	Rdver- mögen γ	10^3 K. mögen γ
10	27,9	31,6	32,4	38,6	24,8	31,6
20	43,5	35,6	48,9	42,7	35,6	29,4
30	48,0	31,8	52,1	42,6	41,6	29,1
40	50,8	30,7	53,7	40,6	44,9	29,7
50	52,1	29,1	54,5	40,8	46,6	30,7
$\alpha = 54$		$\alpha = 55$		$\alpha = 48$		$\alpha = 46$
				$\alpha = 48$		$\alpha = 46$
				$\alpha = 46$		$\alpha = 45$
				$\alpha = 45$		$\alpha = 50$

Tabelle VI.

1 Prozent. Stärkelösung. Enzym: 50 cem verdünnt bis 100 cem. Totalvolumen 225 cem, wovon 10 cem Enzymlösung.

KH_2PO_4 in mg pro cem	0,0	13,33	17,78	4,44 + KOH	8,89 + KOH	13,33 + KOH	17,78 + KOH
Zeit in Min.	Rdver- mögen γ	10^3 K. mögen γ	Rdver- mögen γ	10^3 K. mögen γ	Rdver- mögen γ	10^3 K. mögen γ	Rdver- mögen γ
10	28,7	29,6	33,4	35,3	36,1	37,4	22,5
20	46,2	34,6	51,7	42,9	56,1	49,5	35,2
30	53,6	37,3	56,1	39,6	59,6	44,4	43,5
40	54,5	30,5	57,8	35,9	60,6	37,9	48,9
50	56,1	29,9	59,2	37,5	61,9	40,4	52,1
$\alpha = 58$		$\alpha = 60$		$\alpha = 62,5$		$\alpha = 55$	$\alpha = 55$
				$\alpha = 55$		$\alpha = 55$	$\alpha = 55$
				$\alpha = 55$		$\alpha = 55$	$\alpha = 55$
				$\alpha = 55$		$\alpha = 55$	$\alpha = 55$

 γ in mg Maltose ausgedrückt.

wird, bestand. — Neutrales Phosphat wirkt folglich auf die Reaktion der Malzdiastase hemmend.

Eine Trübung entstand auch bei diesen Versuchen, und hier machte ich die Beobachtung, daß diese in einem bestimmten Verhältnis zu der in dem ersten Teile der Reaktion entstandenen Maltosemenge steht, in dem Maße, daß sie kleiner wurde, je später die Trübung eintrat. Diese Trübung kann also nicht auf der Konzentration der H-Ionen beruhen. Da die Erscheinung indessen davon abhängig sein mußte, daß die in den Enzymlösungen befindlichen Eiweißstoffe koaguliert wurden, so scheint mir die am nächsten liegende Erklärung die zu sein, daß diese Koagulierung eintritt, wenn eine gewisse Konzentration der Maltose in der Lösung erreicht ist, oder mit anderen Worten, wenn eine bestimmte Menge der vorhandenen Stärke hydrolysiert ist. Das Ausfallen kann dann darauf beruhen, daß die vorhandenen Elektrolyten, die von der kolloiden Stärke adsorbiert waren, durch die Hydrolyse frei werden und auf die Eiweißstoffe fällend wirken.

Saures und neutrales Phosphat haben also gerade entgegengesetzte Wirkungen auf die Hydrolyse. Daß neutrales Phosphat von wirklich hemmender Natur ist, geht deutlich aus den in Tabelle V unter der Bezeichnung $0,44 + \text{KOH} + 0,44$ veranschaulichten Versuchen hervor. Bei diesen Versuchen verfuhr ich nämlich so, daß gleiche Mengen¹⁾ neutralen und sauren Phosphats hinzugesetzt wurden. Es zeigte sich in diesem Falle, daß die Reaktionsgeschwindigkeit bedeutend kleiner als bei einfacher Wirkung von saurem Phosphat war. Wenn neutrales Phosphat nicht hemmende Wirkung hätte, so müßte gewiß bei diesem Versuche die gleiche Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden wie bei einfacher Einwirkung der gleichen Menge sauren Phosphates.

Es mußte also ein wesentlicher Unterschied in der Wirkungsart des sauren und neutralen Phosphates vorliegen. Es erschien mir möglich, daß dieser Unterschied im Zusammenhange mit den in den Enzymlösungen befindlichen Eiweißstoffen stand. Für den Fall, daß dies wirklich zutrifft, müßte, wenn die in den Enzymlösungen befindlichen Eiweiß-

¹⁾ d. h. gleich in bezug auf den Gehalt von PO_4 .

stoffe ganz oder teilweise entfernt würden, die Wirkung des Phosphates, die auf dem Vorhandensein dieser Stoffe beruhte, aufhören oder vermindert werden. Es galt daher einen Weg zur Entfernung der Eiweißstoffe zu finden, der ohne die Konzentration des Enzymes allzu sehr zu verändern, doch ein schnelles Entfernen dieser Stoffe ermöglichte. Die Reaktionsgeschwindigkeit zeigte sich nämlich, wie aus später näher beschriebenen Versuchen hervorgeht, auch abhängig von dem Alter des Enzyms.

L. Michaelis und M. Ehrenreich¹⁾ haben gezeigt, daß Malzdiastase von Kaolin nicht bei neutraler oder alkalischer, wohl aber bei saurer Reaktion adsorbiert wird. Ich benutzte dies Verhalten, um die Konzentration der Eiweißstoffe in den Enzymlösungen auf im folgenden beschriebene Art zu verändern.

Versuche mit kaolinbehandelten Enzymlösungen.

200 ccm der klar filtrierten Enzymlösung wurden mit 50 g wohl ausgewässerten Kaolins genau 10 Minuten lang in einem Mörser gerührt, worauf die Lösung durch Faltenfilter bis zu vollständiger Klarheit filtriert und dann in den Verdünnungen, die in den Tabellen näher angegeben sind, angewandt wurde. Die Ergebnisse der ausgeführten Versuche werden durch die Tabellen VII, VIII und IX dargelegt. Aus ihnen geht her-

Tabelle VII.

1prozent. Stärkelösung. Enzym: Kaolinbehandelt. Unverdünnt. Totalvolumen 220 ccm, wovon 5 ccm Enzymlösung.

KH_2PO_4 in mg pro ccm	0,0	4,55	8,89	4,55 + KOH	13,33 + KOH
Zeit in Min.	Rd.- verm. ²⁾ 10 ³ K.	Rd.- verm. ²⁾ 10 ³ K.	Rd.- verm. ²⁾ 10 ³ K.	Rd.- verm. ²⁾ 10 ³ K.	Rd.- verm. ²⁾ 10 ³ K.
10	26,6 32,0	27,4 32,5	29,8 37,0	8,3 23,3	8,3 23,3
20	40,3 33,7	42,6 37,1	43,5 39,3	11,6 18,8	11,6 18,8
30	46,2 34,2	47,1 34,2	48,5 39,0	13,5 16,3	14,4 18,4
40	47,1 27,9	48,9 30,8	48,9 30,8	15,5 16,2	16,1 17,8
50	48,0 25,6	49,8 27,5	49,8 27,5	17,0 16,5	18,0 20,0
	$\alpha = 51$	$\alpha = 52$	$\alpha = 52$	$\alpha = 20$	$\alpha = 20$

¹⁾ Biochem. Ztschr. 10, 299.

²⁾ in mg Maltose ausgedrückt.

Tabelle VIII.

1 prozent. Stärkelösung. Enzym: Kaolinbehandelt. 25 ccm verdünnt bis 100 ccm. Totalvolumen 220 ccm, wovon 5 ccm Enzymlösung.

KH_2PO_4 in mg pro ccm	0,0		4,55		8,89		13,33		4,55 + KOH		13,33 + KOH	
Zeit in Min.	Red.- Vm. ¹⁾	10 ³ K.	Red.- Vm. ¹⁾	10 ³ K.	Red.- Vm. ¹⁾	10 ³ K.	Red.- Vm. ¹⁾	10 ³ K.	Red.- Vm. ¹⁾	10 ³ K.	Red.- Vm. ¹⁾	10 ³ K.
10	10,7	9,4	14,0	12,8	14,4	13,2	11,6	10,3	9,7	8,4	9,7	8,4
20	21,7	10,4	25,2	13,3	24,2	13,1	25,2	13,3	17,0	8,0	17,0	8,0
30	30,5	11,7	32,9	13,1	33,4	13,5	31,5	13,2	24,2	8,1	22,5	7,6
40	37,0	11,8	39,8	13,9	39,8	13,9	38,9	13,3	28,7	8,0	26,0	7,0
50	41,6	12,2	43,0	13,2	43,5	13,6	44,4	14,3	32,4	7,7	32,4	7,7
	$\alpha = 55$		$\alpha = 55$		$\alpha = 55$		$\alpha = 55$		$\alpha = 55$		$\alpha = 55$	

Tabelle IX.

1 prozent. Stärkelösungen. Enzym: siehe weiter unten. Totalvolumen 230 ccm, wovon 10 ccm Enzymlösung.

A. Enzym: Kaolinbehandelt, 50 ccm verdünnt bis 100 ccm.

KH_2PO_4 in mg pro ccm	0,0		4,35		4,35 + KOH	
Zeit in Minuten	Rdver- mögen ¹⁾	10 ³ K.	Rdver- mögen ¹⁾	10 ³ K.	Rdver- mögen ¹⁾	10 ³ K.
10	19,5	17,8	20,0	17,6	14,0	13,6
20	34,3	19,4	35,6	19,5	26,0	15,0
30	42,1	18,7	46,8	21,9	33,4	14,9
40	49,4	20,7	51,7	21,5	39,4	15,4
50	51,2	18,6	52,7	18,4	43,0	15,2
	$\alpha = 58$		$\alpha = 60$		$\alpha = 52$	

B. Enzym: Nicht mit Kaolin behandelt 50 ccm, verdünnt bis 100 ccm.

10	28,7	29,6	32,4	34,6	21,1	22,6
20	45,3	33,0	50,0	42,8	36,1	25,7
30	52,7	34,6	54,5	37,2	43,0	25,4
40	54,5	30,5	57,3	38,5	48,0	28,3
50	56,1	29,9	58,3	38,5	48,9	24,5
	$\alpha = 58$		$\alpha = 59$		$\alpha = 52$	

vor, daß das saure Kaliumphosphat in diesen Fällen keine so sehr befördernde Wirkung auf den Spaltungsprozeß hat, als wenn die Enzymlösungen zuvor nicht mit Kaolin behandelt

¹⁾ in mg Maltose ausgedrückt.

sind, während die hemmenden Wirkungen des neutralen Phosphates noch deutlicher hervortreten.

Die fördernde Wirkung des sauren Phosphates dürfte also mit dem Gehalt an den vorhandenen Eiweißstoffen zusammenhängen. Hierdurch erklärt es sich auch, weshalb mehrere Forscher seine Wirkung so ungleich fanden.

Klar ist, daß bei meinen Versuchen nicht die ganze Menge der vorhandenen Eiweißstoffe durch die Kaolinbehandlung fortgeschafft, sondern daß nur die Konzentration dieser Stoffe vermindert wurde. Wenn also dem sauren Phosphate die Gelegenheit zur längeren Einwirkung gegeben wurde, so mußte seine aktivierende Wirkung wieder hervortreten. Dadurch, daß, wie aus der Tabelle VIII hervorgeht, ich die Enzymlösung in großer Verdünnung nahm, setzte ich die Reaktionsgeschwindigkeit herab und die aktivierende Wirkung trat, wie erwartet, ein.

Die Einwirkung der Phosphate auf die Haltbarkeit und diastatische Kraft des Enzymes.

Schon im Anfange meiner Versuche zeigte es sich, daß die Reaktionsgeschwindigkeit in hohem Grade von dem Alter der Enzymlösungen abhängt, und ebenso zeigten die vorbereitenden Versuche, daß die Phosphatwirkungen beim Benutzen einer alten Enzymlösung andere waren, als bei der Anwendung einer frisch hergestellten. Eine mit diesem Verhalten im Zusammenhange stehende Frage war die, in welchem Grade ein Phosphatzusatz zur Enzymlösung selbst auf die Haltbarkeit und diastatische Kraft derselben einwirkte. Um diese Frage zu beantworten, stellte ich die Versuche an, deren Ergebnisse aus den Tabellen X und XI hervorgehen.

Die Enzymlösung wurde mit Kaolin auf oben beschriebene Art behandelt, und nach Klarfiltrieren 10 Minuten lang im Thermostat gelassen. Nach dieser Zeit wurden beispielsweise 50 ccm der Enzymlösung mit Wasser bis auf 100 ccm verdünnt, und 50 ccm der Enzymlösung wurden mit 30 ccm Wasser und 10 ccm Phosphatlösung, alles von genau 30°, gemischt. Unmittelbar nach dieser Verdünnung wurden die zur Verzuckerung bestimmten Stärkelösungen auf weiter unten angegebene Art mit Enzymlösungen versetzt, und der Rest der

Tabelle X.

1 prozent. Stärkelösung. Enzym: mit Kaolin behandelt, 50 ccm verdünnt bis 100 ccm. Totalvolumen 220 ccm, wovon 10 ccm Enzymlösung.

A. Frisch hergestellte Enzymlösung.

KH ₂ PO ₄ in mg pro ccm	0,0		1,82 ¹⁾		1,82 ²⁾	
Zeit in Minuten	Rdver- mögen ³⁾	10 ³ K.	Rdver- mögen ³⁾	10 ³ K.	Rdver- mögen ³⁾	10 ³ K.
5	15,5	33,9	13,5	29,7	15,9	34,9
10	23,4	29,0	23,9	29,9	25,2	32,3
15	30,5	29,2	31,5	30,9	31,5	30,9
20	35,2	28,7	35,2	28,7	33,4	25,8
25	38,0	27,3	38,9	28,9	38,0	27,3
30	39,8	25,6	42,6	31,6	38,9	24,0
40	40,8	21,1	44,4	28,1	41,6	21,9

 $\alpha = 48$ $\alpha = 48$ $\alpha = 48$

B. 24 Stunden alte Enzymlösung.

5	4,5	14,1	9,7	27,3	7,3	20,3
10	—	—	18,0	30,1	13,5	21,2
15	9,1	10,5	23,4	30,4	19,0	22,7
20	12,0	11,1	27,0	30,1	21,7	21,0
25	15,5	12,6	—	—	23,9	19,9
30	19,0	14,5	23,7	23,1	26,0	22,9
40	21,7	13,9	30,5	20,4	29,8	21,4

 $\alpha = 30$ $\alpha = 36$ $\alpha = 35$

Enzymlösungen wurde wieder in den Thermostat in wohl verschlossenen Flaschen gestellt. Zu jedem Versuche wandte ich 3 Kolben, enthaltend je 200 ccm 1 prozent. Stärkelösung, an.

Kolben Nr. 1 wurde mit 10 ccm Wasser und mit 10 ccm der phosphatfreien Enzymlösung,

Kolben Nr. 2 mit 10 ccm Wasser und 10 ccm der phosphatenthaltenden Enzymlösung,

Kolben Nr. 8 mit 8 ccm Wasser, 2 ccm Phosphatlösung und 10 ccm der phosphatfreien Enzymlösung versetzt.

Durch dieses Verfahren erhielt ich genau gleichen Phosphatgehalt in den beiden letztgenannten Kolben, in denen die

¹⁾ Das Enzym gemischt mit Phosphat.

²⁾ Die Stärkelösung gemischt mit Phosphat.

³⁾ in mg Maltose ausgedrückt.

Tabelle XI.

1 prozent. Stärkelösung. Enzym: mit Kaolin behandelt, 50 cem verdünnt bis 100 cem. Totalvolumen 220 cem, wovon 10 cem Enzymlösung.

A. Frisch hergestellte Enzymlösung.

KH ₂ PO ₄ in mg pro cem	0,0		1,82 + KOH ¹⁾		1,82 + KOH ²⁾	
Zeit in Minuten	Rdver- mögen ³⁾	10 ³ K.	Rdver- mögen ³⁾	10 ³ K.	Rdver- mögen ³⁾	10 ³ K.
5	19,0	41,8	12,6	27,1	14,4	31,8
10	28,7	32,0	22,5	28,3	21,7	26,9
15	36,1	30,9	28,7	27,3	29,8	29,1
20	43,5	33,6	34,3	28,4	34,3	28,4
25	45,3	30,1	37,0	26,9	37,0	26,9
30	46,2	26,5	39,8	27,2	39,8	27,2
40	48,0	22,4	43,5	28,2	44,4	31,4
	$\alpha = 55$		$\alpha = 47$		$\alpha = 47$	

B. 24 Stunden alte Enzymlösung.

5	3,6	21,7	11,6	24,6	9,7	24,1
10	8,3	23,3	22,5	28,3	17,0	24,0
15	9,1	17,6	29,8	29,1	23,4	25,5
20	10,1	15,2	36,1	31,2	27,0	24,4
25	12,0	15,9	38,0	28,7	31,5	26,9
30	13,5	16,3	40,8	29,3	34,3	28,2
40	17,0	21,2	40,8	22,0	34,3	21,2
	$\alpha = 20$		$\alpha = 47$		$\alpha = 40$	

Versuchsbedingungen also gleich waren, mit dem Unterschiede, daß die Enzymlösung des einen, die Stärkelösung des anderen mit Phosphat gemischt waren. Nach 24 Stunden wurden die Versuche mit Benutzung der in dem Thermostat bei 30° verwahrten Enzymlösungen auf dieselbe Art wiederholt. Doch wurden die Enzymlösungen 5 Minuten vor ihrer Anwendung geschüttelt.

Wie aus den Tabellen hervorgeht, wird die diastatische Kraft der reinen Enzymlösungen durch 24stündiges Stehen vermindert. Für die verschiedenen Enzymlösungen sind diese

¹⁾ Das Enzym gemischt mit Phosphat.

²⁾ Die Stärkelösung gemischt mit Phosphat.

³⁾ in mg Maltose ausgedrückt.

Verminderungen ungleiche; so kann z. B. in einer Lösung mit großer diastatischer Kraft nach 24 Stunden diese so herabgesetzt sein, daß diese absolut kleiner ist, als die diastatische Kraft einer 24stündigen alten Enzymlösung, die in frisch hergestelltem Zustande eine bedeutend kleinere diastatische Kraft, als die erstgenannte hatte.

Das aktivierende Vermögen des sauren Kaliumphosphates auf eine alte Enzymlösung ist relativ größer, als ihre Wirkung auf eine frisch hergestellte. Bei den von mir am meisten angewandten Enzymkonzentrationen und mit Kaolin behandelten Enzymlösungen wurde die Reaktionsgeschwindigkeit beim Gebrauche sauren Phosphates und alter Enzymlösung fast verdoppelt.

Wurde die Enzymlösung, mit Phosphat versetzt, aufgehoben, so wurde die Reaktionsgeschwindigkeit beim Anwenden dieser alten Enzymphosphatlösung größer, als beim Anwenden von Phosphatstärkelösung und alter phosphatfreier Enzymlösung. — Saures Phosphat wirkt also konservierend auf Enzymlösungen.

Die Einwirkung neutralen Phosphates auf alte Enzymlösung zeigte sich als von ganz anderer Natur als seine Wirkung auf frisch hergestellte. Auf frische Lösung hat neutrales Phosphat, wie eben gezeigt, rein hemmende Wirkungen, während dasselbe auf alte Enzymlösung aktivierend wirkt. Ebenso wie saures Phosphat wirkt auch neutrales Phosphat konservierend auf Enzymlösungen.

Das Enzym mußte also durch längeres Verwahren in Wasserlösung seine Natur ändern. Man könnte vielleicht annehmen, daß diese Veränderung eine Dissoziation des Enzymes ist. H. Euler und B. af Ugglas fanden bei ihren Versuchen, daß das neutrale Phosphat aktivierend wirkte. Sie haben das Enzym aus sog. Grünmalz bereitet. Ich habe zu meinen Versuchen getrocknetes Malz (sog. Darrmalz) angewandt und habe gefunden, daß neutrales Phosphat eine hemmende Wirkung ausübte. Aber nach längerem Verwahren des Enzymes in Wasserlösung fand ich eine aktivierende Wirkung.

Daß die Phosphateinwirkung auch von der Temperatur abhängt, habe ich durch die in Tabelle XII angeführten Ver-

suche zu zeigen versucht. Ich ließ Phosphat auf das Enzym bei einer höheren, so gewählten Temperatur einwirken, daß das reine Enzym nicht koaguliert wurde, sondern wenn möglich seine diastatische Kraft beibehielt.

Tabelle XII.

1 prozent. Stärkelösung. Enzym: mit Kaolin behandelt, 50 ccm verdünnt bis 100 ccm. Totalvolumen 220 ccm, wovon 10 ccm Enzymlösung.

A. Vor Erwärmen des Enzymes.

Zeit in Minuten	0,0		1,82		1,82 + KOH	
	Rdver- mögen ¹⁾	10 ³ K.	Rdver- mögen ¹⁾	10 ³ K.	Rdver- mögen ¹⁾	10 ³ K.
10	20,0	20,6	20,7	21,5	18,6	19,4
20	35,2	23,6	35,2	23,6	26,6	18,7
30	42,6	23,6	42,6	23,6	34,7	20,3
40	46,2	22,3	47,1	23,8	39,8	21,7
50	49,8	24,4	48,9	22,2	43,5	24,6
	$\alpha = 53$		$\alpha = 53$		$\alpha = 46$	

B. Nach Erwärmen des Enzymes mit Phosphat in 30 Min. auf 50°.

10	20,0	22,1	4,5	22,8	4,1	38,3
20	29,2	19,0	6,3	18,4	4,5	22,3
30	—	—	7,3	15,8	4,9	17,4
40	40,8	18,4	8,3	15,3	5,4	16,0
50	46,2	22,4	9,1	15,2	6,3	24,0
	$\alpha = 50$		$\alpha = 11$		$\alpha = 7$	

Die Versuche wurden so ausgeführt, daß die Enzymlösungen, die mit Phosphat auf dieselbe Art wie die zu den in den Tabellen X und XI angegebenen Versuchen benutzten Enzymlösungen zubereitet und gemischt waren, 30 Minuten bei 50° in einem Wasserbade erhitzt wurden, worauf sie auf gewöhnliche Art angewandt wurden.

Wie aus den Tabellen hervorgeht, wird die diastatische Kraft durch dies Verfahren vermindert. Bei diesen Versuchen entstand während des Erhitzens eine Trübung in den Enzymlösungen. Die Eiweißstoffe wurden also koaguliert, und es schien, als ob die aktivierende Wirkung des sauren und neu-

¹⁾ in mg Maltose ausgedrückt.

tralen Phosphates seinen Grund in der Einwirkung der Phosphate auf die in den Enzymlösungen befindlichen Eiweißstoffe hätte.

Zusammenfassung.

Die diastatische Spaltung folgt im ersten Teile der Reaktion der logarithmischen Kurve; und zwar so, als ob nicht die ganze vorhandene Menge, sondern nur ein Teil der Stärke gespalten wird. Die Größe dieses Teiles ist veränderlich mit den Konzentrationen des Substrates des Enzymes, der vorhandenen Elektrolyten und Eiweißstoffe. In ihrem letzteren Teile geht die Reaktion mit äußerst geringer Geschwindigkeit weiter.

Saures Kaliumphosphat übt in den untersuchten Konzentrationen eine aktivierende und konservierende Wirkung auf das Enzym aus.

Neutrales Kaliumphosphat übt unter den eingehaltenen Bedingungen auf frisch hergestellte Malzdiastaselösung eine hemmende Wirkung, auf alte Enzymlösung eine aktivierende Wirkung aus.

Die aktivierenden Wirkungen der Phosphate werden durch die in den Enzymlösungen befindlichen Eiweißstoffe beeinflusst.

Ich spreche Herrn Prof. H. von Euler meinen aufrichtigsten Dank für alle während der Ausführung dieser Arbeit bereitwillig gegebenen Ratschläge und Anweisungen aus.

Organisches Laboratorium der Hochschule in Stockholm.