

# **Einfluß der Reaktion auf die Ptyalinwirkung.**

Von

**W. E. Ringer und H. van Trigt.**

(Mit drei Kurvenzeichnungen im Text.)

(Aus dem Laboratorium für physiologische Chemie der Universität Utrecht.)

(Der Redaktion zugegangen am 25. November 1912.)

Der eine von uns (v. T.) hat sich im hiesigen Laboratorium einige Zeit mit der Frage nach dem Einfluß der Diät auf die Ptyalinaktivität des Speichels beschäftigt. Die Resultate anderer Forscher auf diesem Gebiet sind zum Teil einander recht widersprechende und auch van Trigts Resultate waren insoweit nicht eindeutig, als zwar im allgemeinen ein Diät einfluß aus den Versuchen hervorzugehen schien, aber daneben von Zeit zu Zeit ohne nachweisbare Ursache ganz aus der Reihe fallende Werte erhalten wurden.

Nun können Aktivitätsschwankungen auf verschiedene Weise zustande kommen. Die Enzymkonzentration kann sich ändern oder die «Aktivität» an sich kann zu- oder abnehmen und Änderungen dieser Aktivität könnten auch durch eine die Enzymwirkung beeinflussende Konstitution des Milieus hervorgerufen werden. So könnte es z. B. sein, daß der Organismus den geänderten Bedingungen sich, ohne Änderung der Enzymkonzentration, nur mittels einer geeigneteren Zusammensetzung des Milieus anpaßte. Dabei war in erster Linie an die Konzentrationen der die Reaktion beeinflussenden Ionen, besonders H- und OH-Ionen, weiter auch Cl- und andere Ionen zu denken. Auf jeden Fall war es erwünscht, erstens den Einfluß dieser Ionen genau zu kennen und zweitens Änderungen der Konzentrationen dieser Ionen zu verzeichnen, um die Resultate der Versuche so viel wie möglich übersehen zu können.

Was nun den Einfluß der Wasserstoff- und Hydroxylionen auf die Ptyalinwirkung betrifft, so widersprechen auch hier die bisherigen Untersuchungen einander sehr, indem der eine die Wirkung von Säuren, der andere von Alkali gefördert glaubt.<sup>1)</sup> Wir haben es denn auch für erwünscht gehalten, diesen Einfluß der für die meisten Enzymwirkungen so wichtigen H- und OH-Ionen zu studieren.

Wir haben uns dabei im allgemeinen den von Sørensen<sup>2)</sup> in seinen bahnbrechenden Arbeiten über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf Enzymwirkungen (Invertin, Katalase, Pepsin) verwendeten Methoden angeschlossen.

Der Gang der Untersuchung war folgender: Zur Darstellung der gewünschten H-Ionenkonzentrationen wurden verschiedene Puffergemische verwendet, und zwar Phosphatgemische, Citrat- und Acetatgemische. Alle Versuche wurden bei 37° im Thermostaten ausgeführt (Temperaturschwankungen  $\pm 0,05^\circ$ ).

Als Substrat diente Amylum, als Enzym filtrierter Speichel. Die Wirkung des Enzyms wurde durch Titration der Digestionsflüssigkeit nach Bertrand, weiter durch Polarimetrie und durch die Jodreaktion bestimmt.

#### A. Versuche mit Phosphatlösungen.

In Erlenmeyer-Kolben von 300 ccm<sup>3)</sup> wurden gebracht 10 ccm einer Phosphorsäurelösung von 1,485 n. Dazu wurden wechselnde Mengen Natronlauge von 0,5670 n und Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 50 ccm gegeben. In jeden Kolben kamen weiter 200 ccm einer Amylumlösung, welche immer in ganz derselben Weise dargestellt wurde. 25 g getrocknetes Amylum wurden mit einem Liter Wasser bis zum Sieden erhitzt und etwa eine Minute im Sieden erhalten, sodann abgekühlt und mit Wasser auf genau 2 l angefüllt. Dann wurde

<sup>1)</sup> Man siehe die Literatur in Hammarstens Lehrbuch der physiologischen Chemie.

<sup>2)</sup> Comptes rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, 8<sup>e</sup> Volume, 1<sup>re</sup> Livraison, 1909.

<sup>3)</sup> Alle gebrauchten Glasgefäße waren aus Jena-Glas und während 15 Minuten ausgedampft.



durch Glaswolle oder auch wohl Nessel Tuch filtriert. Die Kolben einer Versuchsreihe wurden mit derselben Amylumlösung versehen, bisweilen mußten denn auch 4 l der Amylumlösung auf einmal gemacht werden, so sind die Versuche einer jeden Reihe untereinander ganz vergleichbar. Die Kolben mit Phosphatgemisch und Amylumlösung, zusammen 250 ccm, wurden vorgewärmt bis auf 37°, mit Bleibelastung und Porzellandeckel versehen und in den Thermostaten auf 20—30 Minuten auf ein Drahtnetz hingestellt, wobei das Niveau im Kolben einige Zentimeter unter dem Wasserniveau des Thermostaten sich befand. Dann wurden 2 ccm der Enzymlösung zugegeben unter energischem Schütteln und 20 Minuten, während welcher Zeit öfters geschüttelt wurde, digeriert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Kolben in siedendes Wasser gebracht und darin regelmäßig geschüttelt. Wenn die Innentemperatur 90° war, wurde Kolben mit Inhalt in kaltem Wasser abgekühlt. Die Enzymwirkung wurde also nicht in einem Momente abgebrochen, aber die Kolben wurden immer in ganz derselben Weise behandelt und so waren Fehler in der Zeitbemessung der Digestionszeit nicht zu befürchten.

Nach einigen Orientierungsversuchen wurden nun folgende Versuchsreihen angestellt.

#### 1. Versuchsreihe. Digestionsdauer 20 Minuten.

Die Wasserstoffionenkonzentrationen wurden in Lösungen derselben Phosphatgemische, aber zu welchen anstatt 200 ccm Amylumlösung und 2 ccm Enzymlösung 202 ccm Wasser gegeben waren, bestimmt und zwar elektrometrisch mit Normal-Kalomel-elektroden und nach der Schaukelmethode Hasselbalchs,<sup>1)</sup> nachdem sich auch in unserem Laboratorium gezeigt hatte, daß in dieser Weise bei richtigen Elektroden genaue Resultate erzielt werden können. Die Temperatur war dabei 18°.

Die Bertrand'schen Titrations sind auf Milligramme Kupfer berechnet pro 100 ccm Digestionsflüssigkeit. Die Drehungen beziehen sich auf das 10 cm-Rohr und Zimmertemperatur.

<sup>1)</sup> Biochemische Zeitschrift, Bd. 30, S. 317 (1910).

## 1. Versuchsreihe. Enzym v. T., filtriert. Digestionsdauer 20 Minuten.

Nr.	Phosphor- säure- lösung ccm	NaOH ccm	H <sub>2</sub> O ccm	Amylum ccm	Enzym ccm	« Bertrand » mg Cu	Dre- hung	Jod- reak- tion	pH
1	10	13,4	26,6	200	2	71,10	—	—	5,186
2	10	13,7	26,3	200	2	182,15	—	—	5,69
3	10	14	26	200	2	212,30	—	—	5,80
4	10	15	25	200	2	218,95	—	—	6,22
5	10	16	24	200	2	214,85	—	—	6,40
6	10	18	22	200	2	176,50	—	—	6,78

2. Versuchsreihe. Enzym v. T., filtriert. (Zu jeder Reihe wurde neues Enzym und neue Amylumlösung verwendet.)  
Digestionsdauer 20 Minuten.

Nr.	Phosphor- säure ccm	NaOH ccm	H <sub>2</sub> O ccm	Amylum ccm	Enzym ccm	« Bertrand » mg Cu	Dre- hung	Jod- reak- tion	pH
1	10	14	26	200	2	170,35	—	—	—
2	10	14,5	25,5	200	2	187,25	—	—	5,96
3	10	15	25	200	2	185,70	—	—	—
4	10	15,5	24,5	200	2	176,05	—	—	6,38
5	10	16	24	200	2	168,85	—	—	—

3. Versuchsreihe. Enzym v. T., filtriert. pH in den Digestionslösungen bestimmt.  
Digestionsdauer 20 Minuten.

Nr.	Phosphor- säure ccm	NaOH ccm	H <sub>2</sub> O ccm	Amylum ccm	Enzym ccm	« Bertrand » mg Cu	Dre- hung Mi- nuten	Jod- reak- tion	pH
1	10	14	26	200	2	140,45	192,8	blau	5,86
2	10	14,3	25,7	200	2	146,85	191,2	»	6,04
3	10	14,6	25,4	200	2	142,75	190,0	»	6,13
4	10	14,9	25,1	200	2	141,25	192,0	»	6,21
5	10	15,2	24,8	200	2	139,20	192,8	»	6,26



4. Versuchsreihe. Enzym R., filtriert und mit 3 Volumen Wasser verdünnt,  $p_H$  in den digerierten Lösungen bestimmt.

Digestionsdauer 20 Minuten.

Nr.	Phosphorsäure ccm	NaOH ccm	H <sub>2</sub> O ccm	Amylum ccm	Enzym ccm	«Bertrand» mg Cu	Drehung Minuten	Jodreaktion	$p_H$
1	10	13	27	200	2	Keine sichtbare Reduktion	etwa 192	blau	4,53
2	10	13,5	26,5	200	2	180,10	188	blau, Spur violett	5,33
3	10	14	26	200	2	234,80	186	violett, Spur blau	5,86
4	10	14,5	25,5	200	2	241,55	185	violett	6,05
5	10	15	25	200	2	235,40	186,5	violett, Spur blau	6,24
6	10	15,5	24,5	200	2	223,60	188	violett blau	6,30
7	10	17	23	200	2	179,10	191,6	blau, Spur violett	6,61
8	10	20	20	200	2	105,40	195	blau	7,01

5. Versuchsreihe. Enzym D., filtriert,  $p_H$  in den digerierten Lösungen bestimmt.

Digestionsdauer 20 Minuten.

Nr.	Phosphorsäure ccm	NaOH ccm	H <sub>2</sub> O ccm	Amylum ccm	Enzym ccm	«Bertrand» mg Cu	Drehung Minuten	Jodreaktion	$p_H$
1	10	13,2	26,8	200	2	106,45	194	blau	4,90
2	10	13,5	26,5	200	2	194,50	190,3	blau, Spur violett	5,52
3	10	14	26	200	2	251,25	190	violett blau	5,83
4	10	14,5	25,5	200	2	270,10	189,7	violett, Spur blau	6,08
5	10	15	25	200	2	271,20	188	violett	6,19
6	10	15,5	24,5	200	2	265,55	191	violett, Spur blau	6,37
7	10	17	23	200	2	220,55	192	violett blau	6,61
8	10	20	20	200	2	156,60	195	blau	7,03

Aus diesen Versuchsreihen geht hervor, daß mit Enzymen verschiedener Herkunft (v. T., R., D.) und von sehr verschiedener Aktivität (Enzym R. mußte stark verdünnt werden) eine gleiche Beeinflussung der Wirkung des Enzyms durch die  $C_H$  hervortritt. Es war aber nicht unwahrscheinlich, daß der Phosphatpuffer an sich einen Einfluß ausübt. Es wurden

darum zwei Versuchsreihen mit gleichem Enzym, aber a) mit 10 ccm Phosphorsäure, b) mit 2 ccm Phosphorsäure angestellt. Sollte der optimale  $p_H$  hier keine Änderung zeigen, so war ein größerer spezifischer Phosphateinfluß weniger wahrscheinlich.

6. Versuchsreihe. Enzym R. mit 3 Volumen Wasser verdünnt,  
 $p_H$  in den digerierten Lösungen bestimmt.  
 Digestionsdauer 20 Minuten.

Nr.	Phosphor- säure ccm	NaOH ccm	H <sub>2</sub> O ccm	Amy- lum ccm	En- zym ccm	«Bertrand» mg Cu	Dre- hung Mi- nuten	Jodreaktion	$p_H$
a 1	10	13,3	26,7	200	2	149,40	198	blau	5,01
2	10	14	26	200	2	278,90	194,8	violett, Spur blau	5,86
3	10	14,5	25,5	200	2	282,95	190	violett	6,025
4	10	15	25	200	2	272,20	193	violett, Spur blau	6,24
5	10	17	23	200	2	217,95	197,3	blau, Spur violett	6,596
b 1	2	2,6	45,4	200	2	306,45	191,3	violett	5,72
2	2	2,7	45,3	200	2	316,20	190	violett	6,065
3	2	2,8	45,2	200	2	318,20	189	violett	6,255
4	2	2,9	45,1	200	2	298,75	191	violett, Spur blau	6,35
5	2	3,2	44,8	200	2	233,80	193	blau, Spur violett	6,47

Aus dieser Versuchsreihe geht hervor, daß bei 5 facher Verdünnung des Phosphatpuffers der optimale  $p_H$  sich nur sehr unwesentlich verschiebt.

### B. Versuche mit Citratlösungen.

275 g reinste Citronensäure (pro analysi) wurden in reines Wasser gelöst, 105 g NaOH (Mercks e natrio pro analysi) zugegeben und bis auf ein Liter mit Wasser angefüllt. Wechselnde Mengen dieser Citratlösung wurden mit wechselnden Mengen NaOH-Lösung (0,5670 n) zusammengebracht und mit Wasser bis auf 50 ccm angefüllt. Im übrigen war der Gang der Versuche wie bei den Phosphatmischungen.

20 ccm der Citratlösung mit Wasser bis auf 250 ccm angefüllt hatte einen  $p_H = 4,915$ .



7. Versuchsreihe. Enzym R. unverdünnt.  $p_{\text{H}}$  in den digerierten Lösungen gemessen.

Digestionsdauer 20 Minuten.

Nr.	Citrat ccm	NaOH ccm	H <sub>2</sub> O ccm	Amy- lum ccm	En- zym ccm	«Bertrand» mg Cu	Dre- hung Mi- nuten	Jodreaktion	$p_{\text{H}}$
1	10	1,16	38,84	200	2	38,90	200	blau	5,17
2	10	7,35	32,65	200	2	96,70	197,3	blau	5,53
3	10	12,40	27,60	200	2	180,65	195,7	blau, Spur violett	5,83
4	10	14,70	25,30	200	2	227,15	193,6	violett, spur blau	6,00
5	10	15,96	24,04	200	2	244,05	192	violett	6,09
6	10	17,32	22,68	200	2	284,50	192,5	violettrot	6,22
7	10	18,03	21,97	200	2	308,00	190,3	rot	6,28
8	10	19,55	20,45	200	2	343,80	188	hellrot	6,48

Die optimale Reaktion wurde hier nicht erreicht, sie ist im Vergleich mit den Versuchen mit Phosphatpuffern jedenfalls stark nach den kleineren Wasserstoffionenkonzentrationen verschoben. Weiter ergibt sich, daß die Citratgemische einen stark hemmenden Einfluß ausüben, das sehr aktive Enzym R. hier unverdünnt verwendet, gibt keine besonders hohe Digestion. Diese Hemmung scheint bei den weniger sauren Lösungen abzunehmen.

8. Versuchsreihe. Enzym R. unverdünnt,  $p_{\text{H}}$  in den digerierten Lösungen gemessen.

Digestionsdauer 20 Minuten.

Nr.	Citrat ccm	NaOH ccm	H <sub>2</sub> O ccm	Amy- lum ccm	En- zym ccm	«Bertrand» mg Cu	Dre- hung Mi- nuten	Jodreaktion	$p_{\text{H}}$
1	10	14,7	25,3	200	2	247,60	195	blauviolett	5,99
2	10	19,57	20,43	200	2	357,15	189	rotviolett	6,49
3	10	19,94	20,06	200	2	380,15	189	rot, Spur violett	6,526
4	10	20,40	19,6	200	2	380,65	188	rotbraun	6,62
5	10	21,3	18,7	200	2	396,00	187	rotbraun	6,73
6	10	22,1	17,9	200	2	358,65	187	rot, Spur violett	7,09
7	10	23	17,0	200	2	183,15	197	blau, spur violett	7,425

9. Versuchsreihe. Enzym R. mit 1 Volumen Wasser verdünnt,  
 $p_H$  in den digerierten Lösungen gemessen.  
 Digestionsdauer 20 Minuten.

Nr.	Citrat ccm	NaOH ccm	H <sub>2</sub> O ccm	Amy- lum ccm	En- zym ccm	«Bertrand» mg Cu	Dre- hung Mi- nuten	Jodreaktion	$p_H$
1	5	5,0	40	200	2	81,35	202,7	blau	5,80
2	5	8,20	36,8	200	2	139,70	200	»	6,26
3	5	9,78	35,22	200	2	158,10	197	blau, Spur violett	6,55
4	5	10,20	34,80	200	2	147,85	199,3	blau, Spur violett	6,74
5	5	10,65	34,35	200	2	128,45	201	blau	6,85
6	5	10,90	34,10	200	2	107,95	202,7	»	7,046
7	5	11,05	33,95	200	2	90,05	204	»	7,11
8	5	11,30	33,70	200	2	60,90	204,5	»	7,41
9	5	11,60	33,40	200	2	Keine sichtbare Reduktion	205	»	7,497

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß der optimale  $p_H$  bei den Citratmischungen nach den kleineren Wasserstoffionen-  
 konzentrationen verschoben ist, daß diese Verschiebung aber  
 bei kleineren Citratkonzentrationen geringer ist.

### C. Versuche mit Acetatlösungen.

Eine Natriumacetatlösung (170 g pro Liter) wurde mit  
 wechselnden Mengen 1%iger Essigsäure versetzt. Zuerst  
 wurden einige Bestimmungen von  $p_H$  in reinen Acetatmischungen  
 ausgeführt.

Lösung von Na-Acetat ccm	Essigsäure etwa 1% ccm	Wasser ccm	$p_H$
10	0	115	7,55
10	2	113	6,25
10	5	110	5,856
10	10	105	5,54
10	20	95	5,26



Nachdem also die Acetat-Essigsäure-Kurve bestimmt war, wurde folgende 10te Versuchsreihe angestellt. Enzym R. mit 3 Vol. Wasser verdünnt,  $p_H$  in den digerierten Lösungen bestimmt.

Digestionsdauer 20 Minuten.

Nr.	Acetat	Essig- säure	H <sub>2</sub> O	Amy- lum	En- zym	«Bertrand»	Dre- hung Mi- nuten	Jodreaktion	p <sub>H</sub>
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	mg Cu			
1	20	0	30	200	2	47,60	trübe	blau	7,297
2	20	1	29	200	2	137,65	202	blau, Spur violett	6,65
3	20	2	28	200	2	182,65	199	blauviolett	6,55
4	20	4	26	200	2	221,05	198	blauviolett	6,21
5	20	5,6	24,4	200	2	222,05	195	violettblau	6,106
6	20	7	23	200	2	221,55	197	violettblau	5,98
7	20	12	18	200	2	200,05	199	blauviolett	5,78
8	20	30	0	200	2	118,20	200	blau	5,37

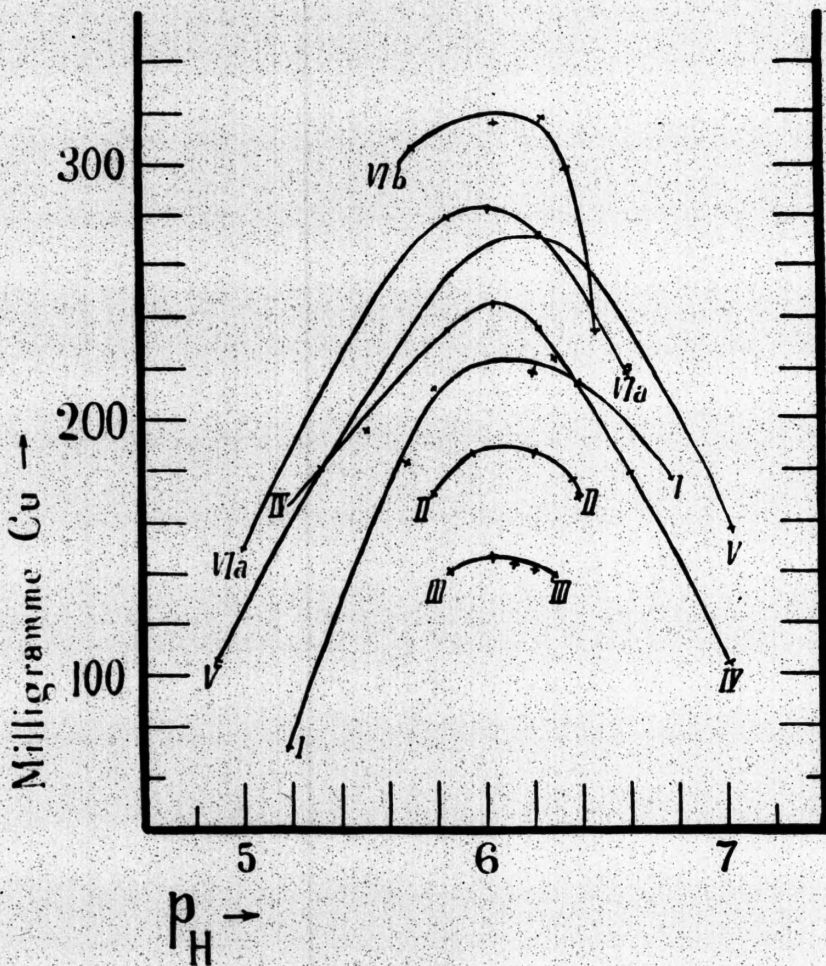


Fig. 1.

Sehen wir uns die Kurven der Phosphatversuche an (Fig. I), so sehen wir, daß die optimale Reaktion bei allen Versuchen bei etwa  $p_H=6,10$  liegt. Die elektrometrischen Bestimmungen wurden bei  $18^\circ$  ausgeführt. Eine Phosphatlösung, sehr in der Nähe dieser optimalen, wurde auch bei  $37^\circ$  gemessen.

10 ccm Phosphorsäure, 14,5 ccm NaOH, 225,5 ccm Wasser  
 bei  $18^\circ$  im Mittel  $p_H=6,03$  bei  $37^\circ$   $p_H=5,929$   
 in reinem Wasser  $p_H=7,070$  in reinem Wasser  $p_H=6,796$ .

Also können wir die optimale Reaktion bei  $37^\circ$  auf  $p_H=6,10-0,101=6,00$  setzen.

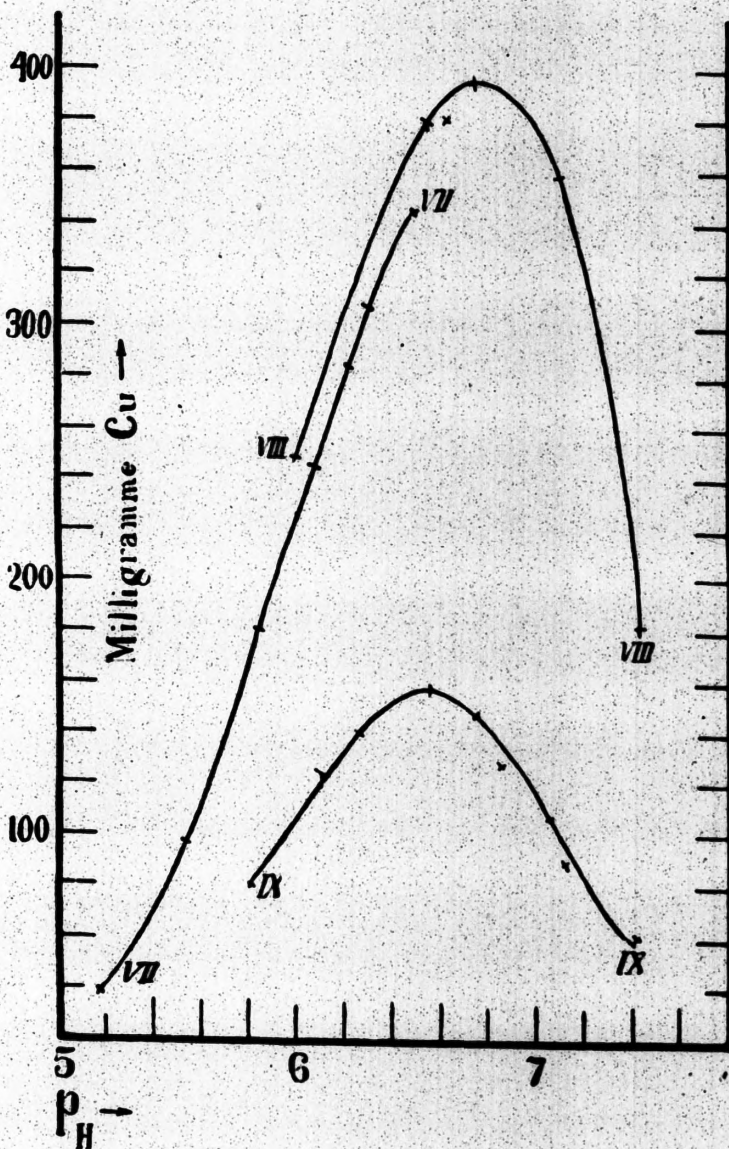


Fig. II.



Aus Figur II sehen wir, daß die optimale Reaktion in den konzentrierteren Citratlösungen bei  $p_H=6,83$ , in den verdünnteren Citratlösungen (Kurve IX) bei  $p_H=6,55$  liegt. Da diese  $p_H$  bei  $18^\circ$  bestimmt wurden, so wurde auch hier eine Citratlösung, sehr in der Nähe der optimalen (mit 10 ccm Citratlösung) bei  $37^\circ$  gemessen.

Citratlösung: 10 ccm Citratlösung, 21,3 ccm NaOH, 218,7 ccm Wasser

bei  $18^\circ$ ,  $p_H=6,73$

bei  $37^\circ$ ,  $p_H=6,765$ .

Die optimale  $p_H$  in den konzentrierteren Citratlösungen ist also bei  $37^\circ$   $p_H=6,86$ , in den verdünnteren also wahrscheinlich bei etwa  $p_H=6,58$ .

Das Optimum ist in den Citratlösungen bedeutend nach der neutralen Seite verschoben. Dies muß einem spezifischen Einfluß des Citrats zugeschrieben werden, weil bei verdünnteren Citratmischungen die optimale Reaktion sich derjenigen der Phosphatversuche nähert. Weiter hemmen die Citratlösungen die Ptyalinwirkung, wie z. B. daraus hervorgeht, daß in Versuchsreihe VIII das äußerst aktive Enzym R. unverdünnt nicht sehr viel höhere «Bertrand»-Zahlen gab als in Versuchsreihe 6 mit 3 Volumina Wasser verdünnt. Die Hemmung scheint an der Seite der kleineren  $p_H$  etwas größer als an der anderen Seite zu sein, daher die Verschiebung des Optimums. Die Hemmung geht aus folgendem Versuch deutlich hervor:

Versuch 11: Enzym R. mit 1 Vol. Wasser verdünnt. Digestionsdauer 20 Minuten.

a) 50 ccm Wasser, 200 ccm Amylum, 2 ccm Enzym, «Bertrand» 318,20 mg Cu. Die elektrometrische  $p_H$ -Bestimmung war hier nicht möglich, die Reaktion war aber gegen Lackmuspapier ganz neutral, also  $p_H$  ( $18^\circ$ ) etwa 7,07.

b) 10 ccm Phosphorsäure, 20,6 ccm NaOH, 19,4 ccm  $H_2O$ , 200 ccm Amylum, 2 ccm Enzym; «Bertrand» 245,05 mg Cu. Reaktion (aus der Phosphatkurve bestimmt)  $p_H=7,07$  ( $18^\circ$ ).

c) wie b, aber 16,25 ccm NaOH und 23,75 ccm  $H_2O$ , «Bertrand» 425,15 mg Cu,  $p_H=6,50$  ( $18^\circ$ ).

d) 10 ccm Citrat, 19,55 ccm NaOH, 20,45 ccm  $H_2O$ , 2 ccm Enzym, 200 ccm Amylum. «Bertrand» 221,55 mg Cu,  $pH=6,468$  ( $18^\circ$ ).

Aus diesem Versuch geht hervor, daß bei neutraler Reaktion die Phosphatmischung deutlich hemmt, die Reduktion sinkt von 318 bis auf 245 mg Cu. Weiter sieht man aber, daß bei einer Reaktion  $pH=6,5$ <sup>1)</sup> die Citratmischung im Vergleich mit der Phosphatmischung sehr stark hemmt, die Kupferzahl sinkt auf etwa die Hälfte. Also die Phosphatmischungen hemmen die Enzymwirkung (wie auch aus Versuchsreihe 6 hervorgeht, in der die Kupferzahlen in den verdünnteren Phosphatlösungen höher sind als in den konzentrierteren), aber die Citratmischungen hemmen weit stärker.

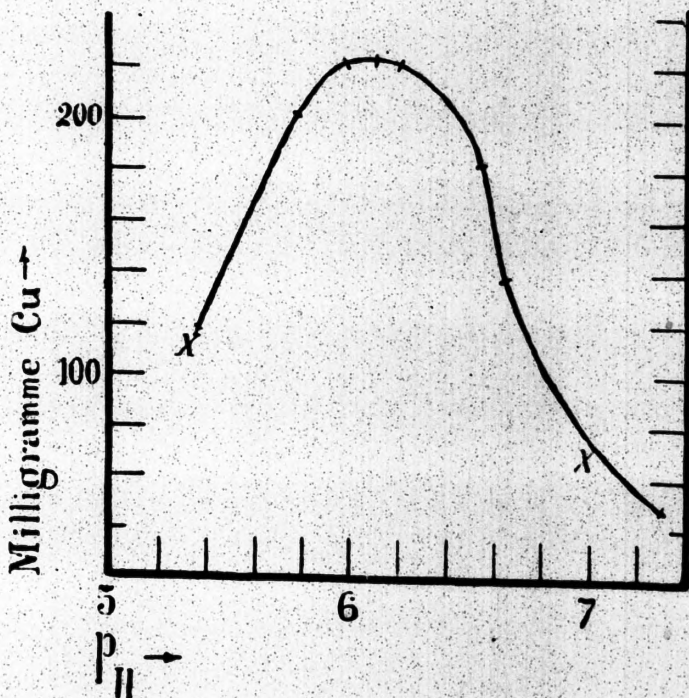


Fig. III.

Aus der Versuchsreihe mit Acetatmischungen (siehe Fig. III) sehen wir, daß hier die optimale Reaktion bei  $pH=6,1$  ( $18^\circ$ ) liegt. Bei  $37^\circ$  wurde hier für  $pH=6,028$  gefunden. Das ist also dieselbe Reaktion als bei den Phosphatmischungen.

<sup>1)</sup> Neutrale Reaktion läßt sich mit Citratlösungen schwierig herstellen.



Hieraus können wir vermuten, daß beide Mischungen die Enzymwirkung in der nämlichen Weise beeinflussen. Folgender Versuch 12 bestätigt diese Vermutung: (Enzym R. mit 1 Vol. Wasser verdünnt).

a) 10 ccm Acetat, 5 ccm Essigsäure, 35 ccm  $H_2O$ , 200 ccm Amylum, 2 ccm Enzym: «Bertrand» 489,20 mg Cu,  $p_H=5,886$ .

b) 10 ccm Phosphorsäure, 14 ccm NaOH, 26 ccm  $H_2O$ , 200 ccm Amylum, 2 ccm Enzym: «Bertrand» 483,50 mg Cu,  $p_H=5,886$ .

Wir sehen also, daß bei der gleichen Reaktion  $p_H=5,886$  Phosphat- und Acetatmischung die Enzymwirkung in ganz derselben Weise beeinflussen. Wie wir oben sahen, hemmt die Phosphatmischung, also muß die Acetatmischung in derselben Weise hemmen.

Fassen wir die bisherigen Resultate zusammen, so können wir sagen, daß die diastatische Wirkung des Ptyalins stark von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig ist. Phosphatmischungen und Mischungen von Acetat und Essigsäure üben einen hemmenden Einfluß aus; in diesen Mischungen ist die optimale Reaktion durch  $p_H=6,00$  gegeben ( $37^\circ$ ). Aus den Kurven können wir schließen, daß bei Reaktionen, gegeben durch  $p_H=4,5$  und  $7,5$  die, diastatische Wirkung nahezu unterdrückt ist.

Citratmischungen hemmen noch weit stärker; in den saureren Lösungen scheint die Hemmung am größten zu sein. Daher ist die Lage des Optimums von der Konzentration der Lösung an Citrat abhängig; im Vergleich mit der Lage in den Phosphat- oder Acetatmischungen ist das Optimum beträchtlich nach der neutralen Seite verschoben, was aus der stärkeren Hemmung in den saureren Lösungen erklärlich ist.

Wir haben beim Ptyalin also einen ähnlichen Einfluß der Reaktion auf die Enzymwirkung gefunden, wie Sørensen und auch Michaelis mit seinen Mitarbeitern bei anderen Enzymen als Pepsin und Invertin beobachteten.<sup>1)</sup>

Wir haben uns dann die Frage gestellt, ob man die hemmende Wirkung größerer Wasserstoffionenkonzentrationen

<sup>1)</sup> Sørensen, l. c. Michaelis, Biochem. Zeitschr., Bd. 35, S. 386; Bd. 36, S. 280.

einer Schädigung des Enzyms zuschreiben muß. Man könnte sich nämlich vorstellen, daß im allgemeinen H-Ionen begünstigend wirken, daß aber bei größeren Aciditäten das Enzym geschädigt wird und daher die Kurve der Enzymwirkung wieder absteigen muß.

Folgender Versuch zeigt aber, daß wenigstens in der Zeit unserer Versuche (alle oben beschriebenen Versuche wurden mit einer Digestionszeit von 20 Minuten angestellt) von Schädigung nicht gut die Rede sein kann.

### Versuchsreihe 13.

Folgende Phosphatmischung wurde hergestellt:

10ccm Phosphorsäure, 13ccm Natronlauge, 27ccm Wasser.

Dann wurden 25 ccm Enzym R. mit 25 ccm Wasser verdünnt, dieses verdünnte Enzym wurde dann zur Phosphatmischung gefügt und sofort 2 ccm zu einer Amylum-Phosphatmischung gegeben zur Bestimmung der Aktivität des Enzyms. Die Enzym-Phosphatmischung wurde dann im Thermostaten bei 37° gehalten und von Zeit zu Zeit 2 ccm zu einem Digestionsversuch herausgenommen. Den Amylum-Phosphatlösungen wurde die aus den Phosphatversuchen gefundene optimale Reaktion gegeben und 20 Minuten digeriert. In die Kolben für die Digestionsversuche kamen:

10 ccm Phosphorsäure, 14,5 ccm Natronlauge, 25,5 ccm Wasser, sodann 200 ccm Amylum. Sie wurden vorgewärmt und wie immer etwa eine halbe Stunde auf 37° erhalten, bevor das Enzym zugegeben wurde. pH der Enzymmischung 5,502. (18°).

### Versuchsreihe 13. Digestionsdauer 20 Minuten.

Nr.	Zeit der Erwärmung (39°) der Enzymmischung Minuten	«Bertrand» mg Cu	Drehung Minuten	pH der digerierten Lösungen
1	0	177,55	194,3	6,06
2	8,75	179,10	—	—
3	16,75	179,10	193,0	6,00
4	41,75	179,10	—	—
5	88,75	179,10	193,0	6,075
6	178,75	181,60	—	—
7	268,75	179,10	193,0	5,975



Wir haben dann bei größerer Acidität noch eine Versuchsreihe angestellt.

### Versuchsreihe 14.

Enzymmischung: 10 ccm Phosphorsäure, 12 ccm Natronlauge, 28 ccm Wasser. Hierzu kamen 25 ccm Enzym R. mit 25 ccm Wasser verdünnt.

Die Amylumlösungen enthielten alle wieder 10 ccm Phosphorsäure, 14,5 ccm Natronlauge, 25,5 ccm Wasser und 200 ccm Amylum, 20 Minuten digeriert.

p<sub>H</sub> der Enzymmischung 4,095.

Nr.	Zeit der Erwärmung (37°) der Enzymmischung Minuten	«Bertrand» mg Cu	Drehung Minuten	pH der digerierten Lösungen
1	0	155,00	201,0	5,98
2	18	147,85	201,7	6,04
3	47,5	139,70	199,0	6,02
Neue Enzymmischung aus demselben Enzym R. hergestellt				
4	0	162,25	199,3	6,03
5	138	113,10	201,5	6,08
6	373	56,30	203	6,03

Aus diesen Versuchen sehen wir, daß in den Enzym-Phosphatmischungen, in welchen das Enzym viermal verdünnt ist, bei 37° bei einem p<sub>H</sub>=5,5 keine merkliche Schädigung des Enzyms stattfindet, dagegen bei einem p<sub>H</sub>=4,1 wird das Enzym allmählich geschadet.

Da aber alle im vorigen beschriebenen Versuche bei einer Digestionsdauer von 20 Minuten angestellt wurden, und in dieser kurzen Zeit die Schädigung sehr gering ist, kann man die absteigenden Äste der Kurven in Fig. I, II und III an der Seite der kleineren p<sub>H</sub> nicht der Schädigung des Enzyms zuschreiben.

Wir haben sodann die mögliche Schädigung des Enzyms nach der anderen Seite, also bei größerem p<sub>H</sub>, studiert.

## Versuchsreihe 15.

Enzymmischung: 10 ccm Phosphorsäure, 27 ccm Natronlauge, 13 ccm Wasser. Hierzu kamen 25 ccm Enzym R. mit 25 ccm Wasser verdünnt.

Die Amylummischungen enthielten alle wieder 10 ccm Phosphorsäure, 14,5 ccm Natronlauge, 25,5 ccm Wasser und 200 ccm Amylum.

pH der Enzymmischung: 8,718 (18°).

Digestionsdauer 20 Minuten.

Nr.	Zeit der Erwärmung der Enzymmischung auf 37° Minuten	«Bertrand» mg Cu	Drehung Minuten	pH der digerierten Lösungen
1	0	142,20	—	—
2	29,5	147,35	—	6,02
3	55,5	147,35	—	—
4	103,5	147,35	—	—
5	255,0	140,70	—	—
6	380,5	134,55	—	—

Also auch bei einem  $p_H=8,72$  ist die Schädigung noch sehr gering und ist nur nach mehreren Stunden etwas merklich. Wir sehen also, daß in dem Reaktionsgebiet der im vorigen beschriebenen Versuche bei einer Digestionszeit von 20 Minuten die Schädigung keine Rolle spielen kann. Dazu kommt noch, daß bei diesen Versuchen ( $p_H$  etwa zwischen 4,5 und 7,5) das Enzym mit Substrat in der Lösung sich befand, also gegen Schädigungen wahrscheinlich noch mehr geschützt war.

Es war also wahrscheinlich, daß auch bei längerer Digestionszeit die Lage der Reaktion der optimalen Enzymwirkung sich nicht merklich verschieben sollte. Folgende Versuchsreihe bestätigt diese Vermutung.

## Versuchsreihe 16.

Durch Vorversuche wurde ermittelt, wieviel das Enzym R. verdünnt werden mußte, um bei einer viel längeren Digestions-



zeit von 100 Minuten die Digestion auf eine günstige, nicht zu große Höhe zu bringen.

Es zeigt sich, daß dazu das Enzym R. mit etwa 7 Vol. Wasser verdünnt werden mußte.

16. Versuchsreihe. Enzym R. mit 7 Volumen Wasser verdünnt,  $p_H$  in den digerierten Lösungen bestimmt. Digestionsdauer 100 Minuten.

Nr.	Phosphorsäure ccm	NaOH ccm	H <sub>2</sub> O ccm	Amylum ccm	Enzym ccm	« Bertrand » mg Cu	Drehung Minuten	Jodreaktion	$p_H$
1	10	13	27	200	2	Keine sichtbare Reduktion	trübe	blau	4,31
2	10	13,5	26,5	200	2	162,70	196	blau, Spur violett	5,48
3	10	14	26	200	2	213,90	193,5	violett, Spur blau	5,80
4	10	14,5	25,5	200	2	216,40	193,5	violett, Spur blau	6,10
5	10	15,5	24,5	200	2	198,50	195	blauviolett	6,34
6	10	17	23	200	2	149,40	198	blau, Spur violett	6,64
7	10	20	20	200	2	77,25	200	blau	6,99

Hieraus geht hervor, daß die optimale Reaktion nur unwesentlich sich geändert hat, vielleicht ist die Lage des Optimums ein wenig nach der sauren Seite hin verschoben, aber die Größe der Verschiebung fällt ganz innerhalb der Versuchsfehler.

Zunächst soll jetzt der Einfluß der Ladung des Enzyms auf seine Wirkung studiert, also die Lage des isoelektrischen Punktes bestimmt werden.

### Zusammenfassung.

Die Lage der für Ptyalin optimalen Reaktion wurde in Phosphat-, Citrat- und Acetatmischungen bestimmt.

In Phosphat- sowie in Acetatmischungen wurde bei einer Digestionszeit von 20 Minuten und bei 37° hierfür  $p_H=6,00$  gefunden. In Citratlösungen zeigte sich die Lage der optimalen Reaktion von der Konzentration des Puffersystems abhängig. In Vergleich mit den genannten Regulatorgemischen war in

Citratgemischen die optimale Reaktion nach der neutralen Seite hin verschoben.

Phosphatgemische und Acetatgemische hemmen die Ptyalinwirkung in gleicher Weise, Citratlösungen hemmen weit stärker, zumal die Hemmung hier bei den kleineren  $p_H$  stark ist.

Bei den verwendeten Reaktionen (etwa zwischen 4,5 und 7,5) ist von einer Schädigung des Enzyms innerhalb der Digestionszeit (20 Minuten) nicht die Rede.

Es zeigte sich, daß bei fünfmal längerer Digestionszeit (100 Minuten) die Lage der optimalen Reaktion in Phosphatmischungen sich nicht wesentlich verschoben hatte.