

# HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT

für

# PHYSIOLOGISCHE CHEMIE

unter Mitwirkung von

E. ABDERHALDEN-Halle, SVANTE ARRHENIUS-Stockholm, A. ELLINGER-Frankfurt a. M., G. EMBDEN-Frankfurt a. M., H. EULER-Stockholm, H. FISCHER-Wien, R. GOTTLIEB-Heidelberg, W. v. GULEWITSCH-Moskau, O. HAMMARSTEN-Upsala, S. G. HEDIN-Upsala, V. HENRIQUES-Kopenhagen, G. HOPPE-SEYLER-Kiel, O. KESTNER-Hamburg, F. KNOOP-Freiburg i. Br., L. KREHL-Heidelberg, Wm. KÜSTER-Stuttgart, CARL TH. MÖRNER-Upsala, F. v. MÜLLER-München, J. P. PAWLOW-St. Petersburg, C. A. PEKELHARING-Utrecht, F. PREGL-Graz, W. E. RINGER-Utrecht, E. SALKOWSKI-Berlin, S. P. L. SÖRENSEN-Kopenhagen, H. STEUDEL-Berlin, H. THIERFELDER-Tübingen, K. THOMAS-Berlin, H. WIELAND-München, R. WILLSTÄTTER-München, A. WINDAUS-Göttingen, E. WINTERSTEIN-Zürch, R. v. ZYENEK-Prag.

herausgegeben von

**A. KOSSEL,**

Professor der Physiologie in Heidelberg.

**Einhundertundzwölfter Band.**

**Fünftes und sechstes Heft.**

(Schluß des Bandes.)

(Ausgegeben am 10. März 1921.)

Mit 1 Figur und 8 Kurvenzeichnungen im Text.

BERLIN und LEIPZIG 1921

VEREINIGUNG WISSENSCHAFTLICHER VERLEGER

WALTER DE GRUYTER & Co.

vormals G. J. Göschen'sche Verlagsabhandlung — J. Guttentag, Verlagsbuchhandlung — Georg Reimer — Karl J. Trübner — Veit & Comp.

# EINHUNDERTUNDZWÖLFTER BAND. FÜNFTES UND SECHSTES HEFT.

## Inhalt.

	Seite
<b>v. Euler, H., und Olof Svanberg.</b> Über die Charakterisierung von Amylaselösungen. (Vorläufige Mitteilung.) Mit 7 Kurvenzeichnungen im Text . . . . .	193
<b>Herzog, R. O., und K. Becker.</b> Über das Kristallisationsvermögen hochmolekularer Verbindungen . . . . .	231
<b>Gross, R. Eberhard.</b> Über den Reaktionsverlauf bei Arginase-wirkung . . . . .	236
<b>Hedin, S. G.</b> Über proteolytische Enzyme im normalen und pathologischen Harn . . . . .	252
<b>v. Euler, H., und O. Svanberg.</b> Versuche zur Darstellung hochaktiver Saccharasepräparate. (V. Mitteilung.) Über den Phosphorgehalt gereinigter Saccharaselösungen nach erschöpfender Dialyse und über Mikrobestimmungen des Phosphors . . . . .	282
<b>Schmiesing, Tilde.</b> Die Verdauung von Säuglingsnahrung. Mit 2 Figuren im Text . . . . .	295
<b>Franzen, Hartwig.</b> Über die chemischen Bestandteile grüner Pflanzen. (XII. Mitteilung.) Über die flüchtigen Bestandteile der Eichenblätter. . . . .	301

Für die nächsten Hefte sind Arbeiten eingegangen von:

G. Embden und F. Laquer, G. Embden, P. Meincke und E. Schmitz, G. Embden, E. Grafe und E. Schmitz, G. Embden und E. Grafe, G. Embden, A. C. Wechselmann, E. Adler (2), E. Adler und L. Guenzburg, G. Embden und E. Adler, G. Lyding, P. Panajotakos, F. Cohn, G. Embden und S. Isaac, A. Adam, E. Adler und S. Isaac, H. Lawaczek, H. v. Euler und A. Pettersson, H. Steudel und E. Peiser, H. v. Euler und O. Svanberg (2), S. J. Thannhauser und Berta Ottenstein, (2), E. Salkowski, Urban Olsson, I. Lifschütz (2), Yngve Funcke, Leo Hermanns und P. Sachs (2), H. Thierfelder und E. Schempp, R. Feulgen, H. Wieland und W. Schulenburg, A. Kossel und G. Giese, B. Fuchs, L. Ramberg.

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie erscheint in Bänden von 6 Heften. Preis des Bandes 42 Mark.

Kurze Notizen oder Bemerkungen zu anderen Arbeiten werden in der Regel am Schluß des Heftes und außerhalb der Reihenfolge des Eingangsdatums mitgeteilt. — Bereits in anderen Zeitschriften veröffentlichte Arbeiten, sowie Referate über bereits publizierte Arbeiten werden nicht aufgenommen.

Das Honorar beträgt für den Druckbogen 40 Mark. Von jeder Arbeit werden dem Verfasser 75 Separat-Abdrücke gratis geliefert.

In Bezug auf die Rechtschreibung der Fachausdrücke sind bis auf weiteres die Publikationen der Deutschen chemischen Gesellschaft maßgebend. In zweifelhaften Fällen wird der etymologische und internationale Standpunkt vor dem phonetischen bevorzugt.

# Über die Charakterisierung von Amylaselösungen. (Vorläufige Mitteilung.)

Von

**H. v. Euler und Olof Svanberg.**

(Mit 7 Figuren im Text.)

---

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 27. November 1920.)

---

Zu den Schwierigkeiten, welche sich bei Arbeiten mit einfachen Enzymen wie Saccharase dadurch einstellen, daß die Enzymlösungen einstweilen nur unvollkommen definiert werden können, kommen bei Untersuchungen an Amylasen (wie auch Peptasen) noch die Komplikationen, welche chemisch nicht einheitliche Substrate und stufenweise verlaufende Reaktionen verursachen.

Sämtliche Arbeiten über Amylasen, und besonders die physikalisch chemischen, leiden stark an den Unsicherheiten hinsichtlich der chemischen Natur und des Spaltungsverlaufes der Stärke. Das ist auch der Grund, weshalb bis in die letzte Zeit so auseinandergelungene und seltsame Ergebnisse über enzymatische Stärkespaltung veröffentlicht werden konnten.

Es erschien wünschenswert, möglichst bald eine Einheitlichkeit hinsichtlich der Methodik und der Behandlung des Zahlenmaterials zu schaffen. Endgültig ist dies natürlich erst möglich, wenn so grundsätzliche Fragen, wie nach den Bestandteilen der Stärke und der Art ihrer enzymatischen Spaltung, einigermaßen geklärt sind. Die vorliegende einleitende Mitteilung bezweckt, die erforderlichen Ausgangspunkte für einige diesbezügliche Untersuchungen festzulegen, welche im hiesigen Laboratorium besonders hinsichtlich der Giftempfindlichkeit und der Thermostabilität im Gange sind. Besonders erschien es erforderlich, die Wirkungsfähigkeit der Amylase-

lösungen einerseits eindeutig, gleichzeitig aber in solcher Weise zu definieren, daß sie mit derjenigen anderer Enzymlösungen möglichst direkt vergleichbar wird.

Wir haben uns bei unseren orientierenden Versuchen im wesentlichen auf die Malzamyrase beschränkt und stellen in der folgenden Literaturübersicht keine anderen Arbeiten über Amylasen zusammen als diejenigen, welche sich auf das Enzym des Malzes beziehen.

### I. Frühere Arbeiten über Malzamyrase.

Zunächst sei über das Substrat dieses Enzyms folgendes vorausgeschickt.

Zu den meisten einschlägigen Untersuchungen ist „lösliche Stärke“ verwendet worden. Zur Darstellung derselben hat man bekanntlich zahlreiche Verfahren vorgeschlagen. Wir nennen:

1. die Methode von Lintner<sup>1)</sup>: Digerierung der Stärkekörner mit 7,5%iger Salzsäure während 7 Tagen bei Zimmertemperatur oder während 3 Tagen bei 40°;
2. die Methode von Wolff und Fernbach<sup>2)</sup>: Behandlung der Stärkekörner mit 1‰iger Salzsäure während 15 Minuten, worauf die Säure durch Dekantieren und Waschen entfernt wird. Das Produkt wird beim Erhitzen mit Wasser schnell hochdispers, wie besonders von Frouard (1911) gezeigt wurde;
3. die Methode von Ost<sup>3)</sup>: Erhitzen der mit Wasser verührten Stärke unter Druck;
4. die Acetonfällung nach Wolff und Fernbach<sup>4)</sup>, welche an einer mit Wasser auf 120—150° erhitzten Stärke vorgenommen wird;
5. die Gefriermethoden von Malfitano<sup>5)</sup> und Samec<sup>6)</sup>.

<sup>1)</sup> Lintner, Journ. f. prakt. Chem. Bd 34, S. 378 (1886).

<sup>2)</sup> Wolff und Fernbach, C. r. Bd. 140, S. 1403 (1905).

<sup>3)</sup> Ost, Chem. Ztg. Bd. 19, S. 1501 (1895).

<sup>4)</sup> Wolff und Fernbach, C. r. Bd. 143, S. 363, 380 (1906).

<sup>5)</sup> Malfitano und Moschkoff, C. r. Bd. 150, S. 710 (1910) und Bd. 151, S. 817 (1910).

<sup>6)</sup> Samec und v. Hoeffft, Kolloidchem. Beih. 5, S. 141 (1913).

Es kann als feststehend angesehen werden, daß diese „löslichen Stärken“ — auch wenn sie kein oder nur ein minimales Reduktionsvermögen aufweisen — keine einheitliche Substanz darstellen, sondern daß sie, wie das zu ihrer Herstellung verwendete Ausgangsmaterial, mindestens 2 Substanzen, oder richtiger Substanzgruppen, enthalten, die von verschiedenen Forschern verschieden bezeichnet worden sind. Wir wollen uns bis auf weiteres dem Vorschlag von Maquenne und Roux<sup>1)</sup> anschließen und die beiden Gruppen unter dem Namen „Amylose“ und „Amylopektin“ zusammenfassen.

Die Amylosen sind charakterisiert durch ihre rein blaue Jodreaktion, durch ihren geringen Einfluß auf die innere Reibung des Wassers und durch die Wiederausscheidung aus den Lösungen beim Abkühlen (Retrogradation).

Das Amylopektin gibt mit Jod eine rotviolette Färbung und bildet mit Wasser Kleister, ruft also eine hohe Viskosität hervor. Chemisch ist es nach Samec<sup>2)</sup> charakterisiert durch seinen Gehalt an  $\text{PO}_4$ -Resten.

Was nun die früheren Untersuchungen über die Malz-amylase selbst und über den zeitlichen Verlauf der enzymatischen Stärkespaltung betrifft, so sind dieselben im wesentlichen nach zwei verschiedenen Methoden ausgeführt worden. Nach der einen, welche nunmehr hauptsächlich in der von Wohlgemuth<sup>3)</sup> vorgeschlagenen Form angewandt wird<sup>4)</sup>, bestimmt man die Bedingungen, unter welchen die blaue Jodreaktion einer gewissen Stärkemenge verschwindet. Diese Proben zeichnen sich durch ihre leichte Ausführbarkeit aus und sind offenbar für medizinische Zwecke, wo es auf Vergleiche von Säften usw. hinsichtlich ihrer diastatischen Wirksamkeit ankommt, sehr geeignet.

Kommt es dagegen darauf an, chemisch-dynamische Mes-

<sup>1)</sup> Maquenne und Roux, Ann. Phys. et Chim. Bd. (8) 9, S. 179 (1906).

<sup>2)</sup> Samec, Kolloidchem. Beih. 6, S. 23 (1914).

<sup>3)</sup> Wohlgemuth, Biochem. Zeitschr. Bd. 9, S. 1 (1908).<sup>1)</sup>

<sup>4)</sup> Eine andere Ausführungsform ist von Sherman, Kendall und Clark vorgeschlagen worden (Journ. Amer. Chem. Soc. Bd. 32, S. 1078 [1910]).

sungen an Amylasen auszuführen, so genügt die Jodmethode — wenigstens in den bis jetzt vorgeschlagenen Formen — dazu nicht <sup>1)</sup>. Ihr Prinzip ist, festzustellen, wann das Substrat unter den eingehaltenen Bedingungen verbraucht ist. Aber selbst wenn das Verschwinden der blauen Farbe ein hinreichend scharfes Anzeichen dafür ist, daß das gesamte Stärkesubstrat gespalten worden ist, so gestattet die Methode doch nur, einen limes-Wert zu ermitteln, während der Verlauf der Reaktion bis zum Eintritt dieses Wertes ungemessen bleiben muß. Dies gilt für die ursprünglichen Ausführungsformen dieser Methode von Roberts und von Jungk wie auch für alle folgenden (Francis<sup>2)</sup>, Vernon<sup>3)</sup>, Johnson<sup>4)</sup>, Wohlgemuth<sup>5)</sup>, Sherman, Kendall und Clark<sup>6)</sup>, Sherman und Thomas<sup>7)</sup>).

Von denjenigen Arbeiten, in welchen die Wirkung der Amylase dadurch verfolgt wurde, daß die zunehmende Reduktion der Lösung gegen das Fehlingsche Reagens gemessen wurde, bezweckt eine größere Anzahl nur, den Wirkungswert von Malz oder Malzextrakten zu finden. Auf die wichtigsten dieser Arbeiten kommen wir auf S. 221 zurück.

Es bleiben also hier diejenigen Untersuchungen zu besprechen, welche sich mit den Wirkungsbedingungen der Malz-amyrase und mit dem zeitlichen Verlauf der Verzuckerung beschäftigen.

Die ersten quantitativen Versuche über den Verlauf und die Bedingungen der diastatischen Wirkung des Malzextraktes verdankt man Kjeldahl<sup>8)</sup>.

<sup>1)</sup> Vgl. hierzu auch Sherman, Kendall und Clark, Journ. Amer. Chem. Soc. Bd. 32, S. 1086 (1910).

<sup>2)</sup> Francis, Bull. of Pharm. Bd. 12, S. 52 (1898).

<sup>3)</sup> Vernon, Journ. Physiol. Bd. 27, S. 174 (1901).

<sup>4)</sup> Johnson, Journ. Amer. Chem. Soc. Bd. 30, S. 798 (1908).

<sup>5)</sup> Wohlgemuth l. c.

<sup>6)</sup> Sherman, Kendall und Clark, Journ. Amer. Chem. Soc. Bd. 32, S. 1073 (1910).

<sup>7)</sup> Sherman und Thomas, Journ. Amer. Chem. Soc. Bd. 37, S. 623 (1915).

<sup>8)</sup> Kjeldahl, Medd. Carlsberg-Lab. 1, 1879. — Zeitschr. ges. Brauw. 1880.

Brown und Glendinning<sup>1)</sup> haben sehr exakte systematische Versuche darüber angestellt, ob die Verzuckerung der löslichen Stärke sich der Formel für monomolekulare Reaktionen anschließt.

Die folgende, ihrer Arbeit entnommene Tabelle bezieht sich auf die Verzuckerung einer 3%igen Stärkelösung durch 0,25 ccm Malzextrakt auf 100 ccm Lösung. Temperatur 51–52°.

Minuten	$1 - x$	$k \cdot 10^4$	$k_1 \cdot 10^4$	Minuten	$1 - x$	$k \cdot 10^4$	$k_1 \cdot 10^4$
10	0,8916	50	47	80	0,2615	73	51
20	0,7750	55	50	90	0,2200	73	50
30	0,6650	59	50	100	0,1850	73	50
40	0,5645	62	51	110	0,1500	75	50
50	0,4650	65	52	120	0,1200	76	50
60	0,3850	69	52	140	0,0780	79	50
70	0,3200	71	51	160	0,0500	81	49

Die Konstante  $k$  der monomolekularen Formel steigt stark an, und das gleiche ist auch in den übrigen 3 Tabellen der genannten Autoren der Fall. Brown und Glendinning haben die naheliegende Annahme geprüft, daß die beobachtete Steigerung der Konstanten davon herrührt, daß die zu Beginn der Reaktion entstehenden Dextrine leichter gespalten werden als das ursprüngliche Substrat; ihr Versuch mit Ausgangsmaterial, das verschieden weit vorgespalten war, hat keine Stütze für obige Annahme geliefert.

Für den Koeffizienten  $k_1$  der Formel  $\frac{1}{t} \ln \frac{a+x}{a-x}$  finden sie eine angenäherte Konstanz.

V. Henri<sup>2)</sup> kam bald darauf zu einem Ergebnis, welches von demjenigen der beiden englischen Autoren insofern abwich, als er findet, daß die Konstanten  $k$  um einen gewissen Mittelwert schwanken; „la loi de formation du maltose est donc bien une loi logarithmique“.

Die folgende, seiner Arbeit entnommene Tabelle bezieht

<sup>1)</sup> Brown und Glendinning, Journ. Chem. Soc. Bd 81, S. 388 (1902).

<sup>2)</sup> V. Henri, Lois générales de l'action des diastases. Thèse, Paris (1903).

sich auf einen Versuch mit 3%iger Stärkelösung und Malz-  
amylase; Temperatur 25°.

Minuten	Gebildete Maltose	x a	k · 10 <sup>6</sup>
29	0,090	0,046	707
53	0,179	0,092	790
89	0,283	0,146	769
113	0,358	0,184	781
150	0,459	0,236	779
184	0,552	0,284	788
227	0,641	0,330	766
326	0,865	0,446	787
402	0,977	0,504	757
467	1,121	0,578	802

Bei Variation der Stärkekonzentration findet Henri (S. 121)  
folgende Mengen Maltose in Gramm:

Datum 1902	Versuchsdauer in Minuten	Stärkekonzentration			
		3 %	1,5 %	0,75 %	0,375 %
5. 9.	60	0,192	0,174	0,145	—
6. 9.	40	0,180	0,154	0,124	—
11. 9.	40	0,130	0,114	0,112	0,082
20. 9.	30	0,098	0,104	0,100	—

Im Anschluß an diese Versuche wird die Formel

$$k_3 = \frac{a}{t} \left[ (m - n) \frac{x}{a} + n \ln \frac{a}{a - x} \right] + \frac{1}{t} \log \frac{a}{a - x}$$

vorgeschlagen; die Koeffizienten m und n werden aber nicht  
bestimmt, und demgemäß ist die Formel nicht geprüft.

Auf die Ergebnisse von Pottevin<sup>1)</sup>, Effront<sup>2)</sup> und  
Ling und Davis<sup>3)</sup> kommen wir an anderer Stelle zurück.

Die nächste eingehende Untersuchung über die Ver-  
zuckerung durch Malzamylase stammt von Frl. Philoche<sup>4)</sup>.  
Ihren Bestimmungen nach folgt der zeitliche Verlauf der

<sup>1)</sup> Pottevin, Ann. Inst. Pasteur Bd. 13, S. 665 (1899).

<sup>2)</sup> Effront, Les enzymes et leurs applications (Paris 1899).

<sup>3)</sup> Ling und Davis, Journ. Inst. Brew. Bd. 8, S. 475 (1902).

<sup>4)</sup> Ch. Philoche, Journ. de Chim. Phys. Bd. 6, S. 212 u. 355 (1908).



Verzuckerung von einem gewissen Spaltungsgrad an (etwa 30%) der monomolekularen Formel, vorher nimmt der Reaktionskoeffizient stark ab. Dies zeigt z. B. folgende Versuchsreihe, angestellt mit 2%iger Stärkelösung bei 31,5°.

Minuten	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^4$
25	0,10	30,5
31	0,16	24,4
60	0,25	20,8
90	0,30	17,2
120	0,36	16,1
210	0,53	15,6
246	0,61	16,6
270	0,63	16,0
300	0,66	15,6
420	0,82	17,7
485	0,87	17,6

Über die aus verschiedenen Stärkekonzentrationen gebildete Menge Maltose gibt folgende Zusammenstellung (S. 277) Aufschluß:

Stärke-Konz. in %	1	1,5	2	2,5	3
g-Maltose in 60 Min.	0,24	0,30	0,338	0,397	0,397.

Die Verzuckerung wird nicht direkt proportional mit der anwesenden Diastasemenge gefunden. Bedeutet  $x$  die zur Zeit  $t$  gebildete Maltosemenge,  $c$  die Konzentration des Enzyms in g per 100 ccm Lösung, so ist  $x/c$  nicht konstant, sondern es gilt eine Beziehung

$$\frac{x}{c} = B - Ac \quad \text{oder} \quad x = Bc - Ac^2.$$

Gleichzeitig mit Frl. Philoche hat Chr. Wirth<sup>1)</sup> in Lintners Laboratorium Versuche über die Abhängigkeit der Verzuckerung von der Enzym- und der Stärkekonzentration angestellt, hauptsächlich unter Verfolgung des praktischen Zieles, eine rationelle Bestimmungsmethode für die diastatische Wirksamkeit des Malzes zu finden. Aus seinen Zahlen hat H. van Laer Verzuckerungskonstanten berechnet (unter An-

<sup>1)</sup> Chr. Wirth, Untersuchungen über die Bestimmung der diastatischen Kraft des Malzes und von Malzextrakten. Dissertation, Techn. Hochschule München, 1908.

nahme, daß die angewandte Stärke zu 90% hydrolysiert wird). Er findet, daß diese Konstanten mit steigender Anfangskonzentration der Stärke abnehmen.

Henri van Laer selbst hat eine große Reihe von Experimentalbeiträgen zu dem hier besprochenen Thema geliefert<sup>1) 2) 3)</sup>. Er kommt zu dem Ergebnis, daß bis zu einer Stärkekonzentration von 4,5% die Verzuckerung sich der Formel für monomolekulare Reaktionen anschließt<sup>1d)</sup>. Dabei ist eine geeignete Enzymkonzentration vorausgesetzt; wird das Malzenzym durch Verdünnung oder Erhitzung geschwächt, so liefern die einzelnen Verzuckerungsversuche abnehmende Reaktionskoeffizienten erster Ordnung. Henri van Laer schließt sich, wie auch Marc H. van Laer<sup>4)</sup>, der Auffassung an, daß die Konzentration der Verbindung Amylase-Stärke, also die Konstante des Gleichgewichtes zwischen Enzym und Substrat die Dynamik der enzymatischen Verzuckerung bestimmt.

Neben der Verzuckerung ist oft die Verflüssigung von Stärkekleister als Maß für die Wirkungsfähigkeit der „Diastase“ angegeben worden, teils in der Weise, daß einfach die Zeit bestimmt wurde, nach welcher die „Verflüssigung“ eintrat, teils auch auf Grund von Viskositätsmessungen. Die Literatur hierüber haben wir hier nicht berücksichtigt, schon deswegen, weil der Chemismus dieses Vorgangs noch nicht klar ist und jedenfalls mit demjenigen der Verzuckerung nicht identisch ist, und weil solche Versuche rationell erst dann ausgewertet werden können, wenn das Substrat, das kleisterbildende Amylopektin, in einigermaßen reinem Zustand dargestellt werden kann<sup>5)</sup>.

<sup>1)</sup> H. van Laer, Nouvelles Recherches sur la vitesse de saccharification de l'amidon. Bulletin Acad. roy. de Belgique. a) nr. 7, 611; 1910. — b) nr. 9—10, 707; 1910. — c) nr. 2, 84; 1911. — d) nr. 3, 305; 1911. — e) nr. 4, 362; 1911. — f) nr. 11, 795; 1911. — g) nr. 4, 395; 1911.

<sup>2)</sup> H. van Laer, Bull. Soc. chim. de Belgique 26, 18; 1912.

<sup>3)</sup> H. van Laer, Bull. Soc. roy. Sc. med. et nat. de Bruxelles nr. 5; 1913.

<sup>4)</sup> Marc H. van Laer, Bull. Soc. chim. de Belgique 29, 214; 1920.

<sup>5)</sup> Vgl. hierzu Gaŕin-Gruzewska, Journ. de physiol. et path. gén. 14, 7; 1912.

## II. Neue Versuche über die enzymatische Verzuckerung.

### A. Die Darstellung der Enzymlösungen.

Lösung 1. 114 g feingestoßenes Darmmalz wurde bei Zimmertemperatur mit 400 ccm destilliertem Wasser während 1 1/2 Tagen extrahiert. Das Ganze wurde nun auf ein Tuch gebracht, filtriert und fast bis zur Trockenheit gepreßt. Die stark trübe Lösung wurde zuletzt durch Faltenfilter klar filtriert, wobei eine gelbe Lösung vom Trockengewicht 4,77% erhalten wurde. 1 ccm dieser Lösung enthielt (Analysen nach Bertrand) 45,7 mg Maltose, also 96% des Trockengewichts.

Da der größte Teil des Trockengehaltes der Amylase-lösung aus Zucker bestand, konnte eine sehr weitgehende Reinigung der Lösung durch Dialyse in geschlossenen Kollodiummembranen erzielt werden. Es wurde dabei genau dieselbe Versuchsanordnung verwendet, wie wir früher bei der Reinigung der Saccharase durch Dialyse beschrieben haben (III. Mitteilung, Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 177 [1920]). Eine 8%ige Zuckerlösung wird in einer solchen Diffusionshülse in wenigen Stunden fast zuckerfrei (loc. cit. S. 178).

110 ccm der Lösung 1 wurden während zweier Tage in 8 geschlossenen Hülsen gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die dadurch erzielten Veränderungen der Lösung gehen aus der Tabelle hervor:

	Trockensubstanz- gehalt %	1 ccm gibt bei Gegen- wart von 0,5 g Stärke bei 37° die Verzucker- ungskonstante k	Verzuckerungs- fähigkeit pro g Trockengewicht der Lösung
Lösung 1	4,8	0,078 (Beil. 2)	0,61
2 Tage dialy- siert	0,077	0,024 (Beil. 14—15)	11,7

(Die Begriffe „Verzuckerungskonstante“ k und „Verzuckerungsfähigkeit“ Sf sollen im Kapitel III definiert werden.)

Durch die Dialyse wird also bereits 98,4% des Trockengewichts des Malzauszuges aus der Enzymlösung entfernt. Gleichzeitig wird aber auch das Enzym bis 30% des Ausgangswertes geschwächt, so daß die Verbesserung der enzymatischen Aktivität der Trockensubstanz eine 19—20fache wird.

Die Darstellung der Enzymlösung wurde wiederholt.

Lösung 2. 130 g feingeriebenes Malz wurde bei Zimmertemperatur 3 Tage mit 400 ccm destilliertem Wasser extrahiert. Der Malzbrei befand sich in einer Stöpselflasche, die oft geschüttelt wurde. Nach Abpressung durch das Tuch wurde die von Stärkekörnchen stark getrübe Lösung zur Klarheit filtriert. Das stark gelbe Malzextrakt hatte pro ccm einen Maltosegehalt von 75,5 mg (7,55%).

160 ccm der Lösung 2 wurden in 12 Kollodiumsäcken gegen destilliertes Wasser dialysiert. 2 Säcke wurden nach 20stündiger Dialyse geöffnet, die Hauptmenge jedoch erst nach 40 Stunden untersucht.

	Trockensubstanz- gehalt %	1 ccm gibt bei Gegen- wart von 0,5 g Stärke bei 37° die Verzucke- rungskonstante	Verzuckerungs- fähigkeit pro g Trockengewicht der Lösung
Lösung 2	8,0	0,11 (Beil. 53)	0,52
Nach 20stünd. Dialyse	0,30	0,065 ( „ 54)	8,1
Nach 40stünd. Dialyse	0,14	0,062 ( „ 55)	16,6

Durch die 40stündige Dialyse wurde diesmal 98,25% der Trockensubstanz entfernt; die Enzymaktivierung ist etwas weniger hervortretend als im vorigen Falle und die Verbesserung der Aktivität pro g Trockengewicht über 30fach.

Der nach der Dialyse in den Enzymlösungen verbleibende Rest der Trockensubstanz dürfte zum größten Teil aus Eiweißstoffen bestehen — die 40 Stunden dialysierte Lösung zeigte eine deutliche Hitzekoagulation —, möglicherweise sind auch durch das Enzym nicht spaltbare höhere Kohlenhydrate vorhanden.

Die Ursache der Schwächung des Enzyms während der Dialyse beruht nicht — wie nach unseren gegenwärtigen Kenntnissen über die Wirkungsbedingungen der Speicheldiastase von vornherein möglich erscheint<sup>1)</sup> — auf einer Entfernung anorganischer Ionen (geprüft wurden Phosphat, Chlorid, Nitrat, Sulfat, Natrium, Kalium, vgl. weiter unten).

Die Amylase-Lösungen wurden in Gegenwart von Toluol dargestellt und durch das gleiche Antiseptikum steril gehalten: die Schädigung des Enzyms durch Toluol kann nur minimal sein. Die Stabilität der gelösten Amylase ist bei Zimmertemperatur zwar nicht so groß wie die der gelösten Saccharase, immerhin sind die mit Toluol steril gehaltenen Lösungen mehrere Wochen lang brauchbar. Durch zweiwöchentliches Aufbewahren der dialysierten Lösung bei Zimmertemperatur ist ihre Verzuckerungsfähigkeit von 11,7 auf 10,7 zurückgegangen (vgl. Beil. 16;  $k$  nimmt ab von 0,024 bis 0,022).

### B. Das angewandte Substrat.

Bereits auf S. 195 ist betont worden, daß die „lösliche Stärke“ kein eindeutig definiertes Substrat darstellt. Es ist zwar noch nicht sicher, aber, besonders durch die Untersuchungen von Samec und seinen Mitarbeitern, sehr wahrscheinlich, daß die zwei Bestandteile, welche die Stärke enthält, sich durch ihre chemische Zusammensetzung unterscheiden. Zweitens hängt noch die Angreifbarkeit der löslichen Stärke von ihrem Molekularzustand<sup>2)</sup>, also ihrem Dispersitätsgrad und ihrem Hydratationsgrad ab. Es scheint im Bereich der Möglichkeit zu liegen, reine (amylopektinfreie) Amylose darzustellen, und wenn dieses gelungen ist, wird man Wirksamkeitsbestimmungen auf dieses Substrat zu beziehen haben. Um auch unsere hier mitgeteilten vorläufigen Messungen dann umrechnen zu können, haben wir versucht, unser Präparat zu charakterisieren, unabhängig von seinem Verhalten zur Amylase. Nach den von Herrn Myrbäck aus-

<sup>1)</sup> Michaelis u. Pechstein, Biochem. Zeitschr. Bd. 59, S. 77 (1914).

<sup>2)</sup> Siehe auch Lindner, Zeitschr. ges. Brauw. 1909, S. 635 und Sallinger, Diss., München 1919.

geführten Versuchen eignet sich hierzu am besten die Bestimmung der maximalen, von einer gewissen Menge Stärkepräparat aufgenommenen Jodmenge. Indem wir auf die diesbezügliche Mitteilung verweisen, können wir uns hier darauf beschränken, anzugeben, daß von unserer zu den meisten Versuchen angewandten löslichen Stärke 1 g aus annähernd gesättigter Jod-Benzollösung 18,5 % Jod aufnimmt<sup>1)</sup>, und zwar nach 45 Minuten langem Erhitzen auf 100°.

Eine in gleicher Weise durch Erhitzen vorbehandelte Lösung von 1,10% dieser löslichen Stärke in destilliertem Wasser zeigt bei 18° eine relative Viskosität von 1,10.

Über die relative Angreifbarkeit der beiden Stärkepräparate und den Einfluß des Erhitzens siehe S. 221.

### C. Der zeitliche Verlauf der Verzuckerung und seine Abhängigkeit von Enzym- und Substratkonzentrationen.

#### 1. Methodisches.

Es wurde mit folgenden Volumverhältnissen gearbeitet:

25 ccm (meist 2%ige) Stärkelösung

10 ccm Phosphatgemisch (0,29 mol. Kaliumphosphat vom Mischungsverhältnis 0,5;  $p_H = 5,6$ , Optimum)

1 ccm Enzymlösung

36 ccm.

Die Versuche wurden in 100 ccm-Erlenmeyerkolben ausgeführt, die im Wasserbade auf konstanter Temperatur gehalten wurden. Das Enzym wurde erst zugesetzt, wenn das Stärke-Phosphatgemisch die richtige Temperatur angenommen hatte. In Zeitintervallen, die mit einem Chronoskop gemessen wurden, geschah die Entnahme von Proben zu je 10 ccm Flüssigkeit; sie wurden in 10 ccm 5%ige Sodalösung einpipettiert, wodurch die Reaktion vollständig gehemmt wird.

<sup>1)</sup> Um eine Vorstellung davon zu geben, wie stark sich verschiedene Präparate „lösliche Stärke“ in dieser Hinsicht voneinander unterscheiden, mag hier angegeben werden, daß andere nach verschiedenen Vorschriften aus Kartoffelstärke dargestellte „lösliche Stärken“ per g weniger als  $\frac{1}{3}$  des oben erwähnten Präparates aus Benzollösung binden.

Die einzelnen Proben wurden dann nach Bertrands Methode analysiert.

Die Versuche wurden, wo nichts anderes angegeben ist, bei  $37^{\circ}$  ausgeführt.

## 2. Vorversuche.

### Einfluß verschiedener Enzymmengen bei $37^{\circ}$ .

Zuerst wurden zwei Versuche bei  $37^{\circ}$  ausgeführt mit den Enzymmengen 1 bzw. 2 ccm in 72 ccm Reaktionsgemisch (siehe Beil. 1 und 2). Die Resultate dieser Versuche (vgl. die Fig. 1 und 2) können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

I. Das erste Stadium der Verzuckerung ist eine beinahe monomolekular verlaufende Reaktion, wobei (bei dem vorliegenden Stärkematerial) aus 1 g Stärke, unabhängig von der Enzymmenge, angenähert 750 mg Maltose entsteht.

II. Die Reaktionskonstante (die Verzuckerungsgeschwindigkeit) ist der Enzymkonzentration angenähert proportional.

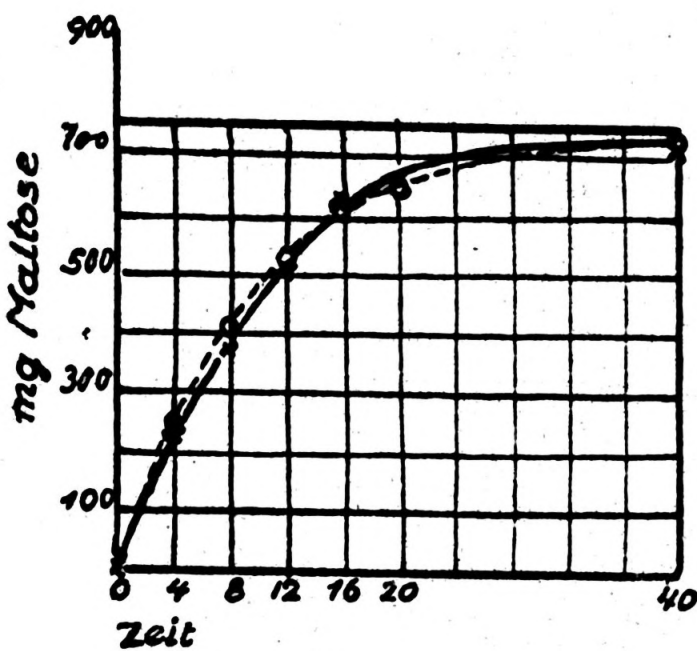


Fig. 1.

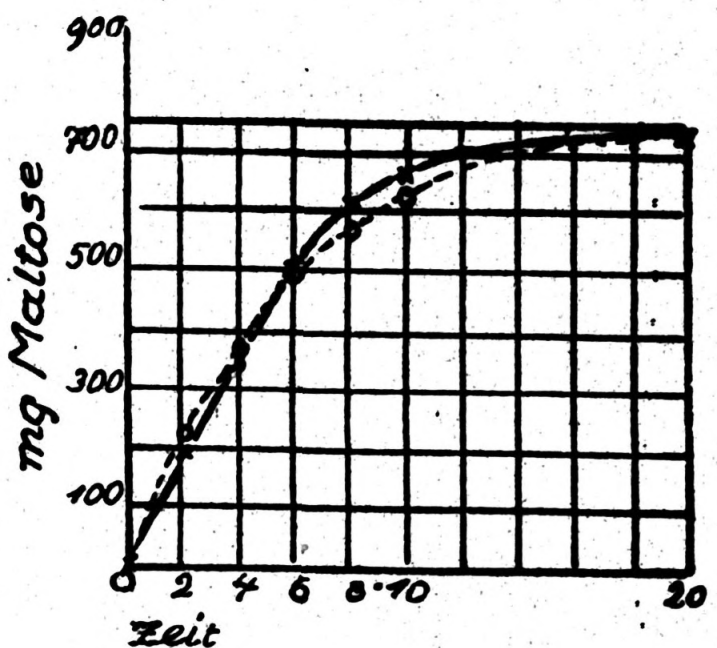


Fig. 2.

(Die beobachteten Zuckermengen sind durch X, die aus den Reaktionskonstanten 0,044 bzw. 0,078 berechneten durch o in den Figuren eingetragen.)

### Verzuckerung bei $52^{\circ}$ .

Es wurde in zwei Versuchen bei  $52^{\circ}$  untersucht, ob die bei  $37^{\circ}$  gefundene Spaltungsgrenze (75%) von der Temperatur abhängt.

Daß dies nicht der Fall ist, geht aus den Versuchen (Beil. 3 und 4) sowie aus der hier mitgeteilten Spaltungskurve Fig. 3 hervor, wo die beobachteten Punkte durch o (Beil. 3) und X (Beil. 4) dargestellt werden.

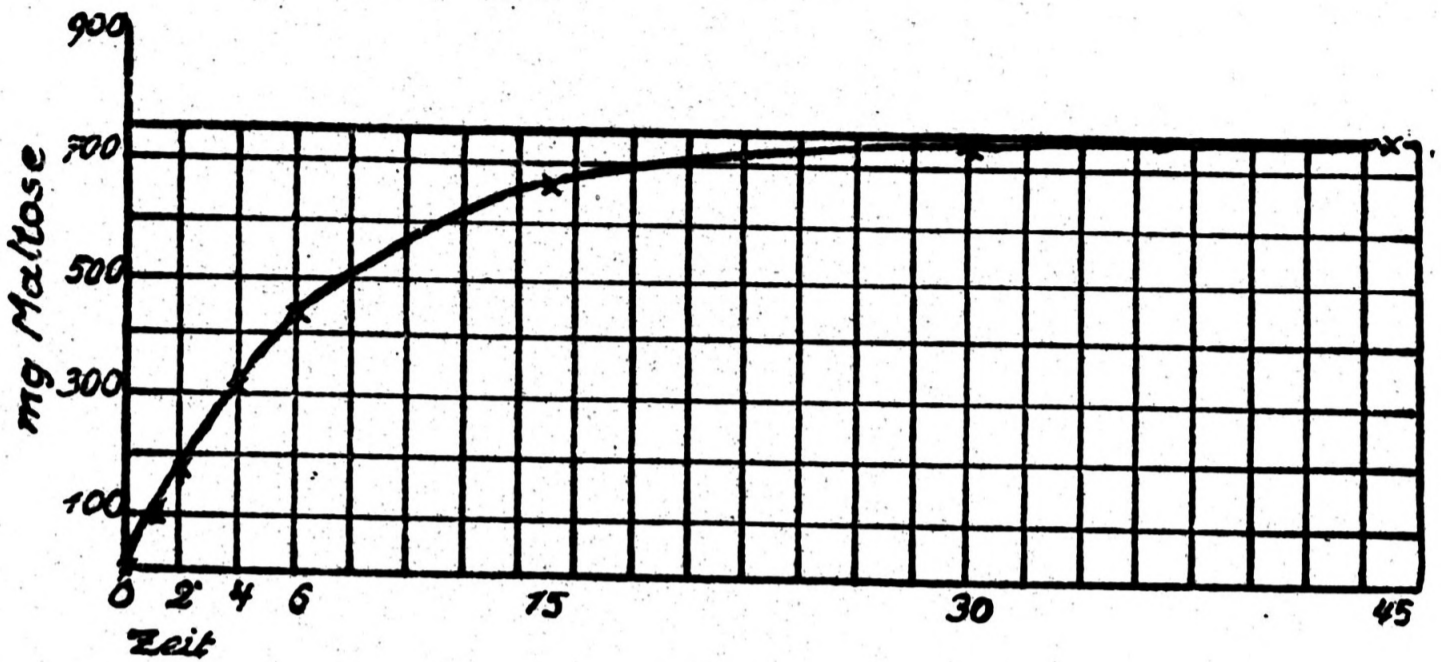


Fig. 3.

#### Verzuckerung mit Speicheldiastase.

Dieser Versuch wurde ausgeführt genau wie die vorigen, jedoch bei  $p_H$  6,1 (Optimum der Phosphat-Diastase nach Michaelis). Versuchstemperatur  $37^\circ$ . Als Enzym dienten 2 ccm Speichel, welcher vollständig zuckerfrei war. Die Spaltungskurve ist in Fig. 4 dargestellt.

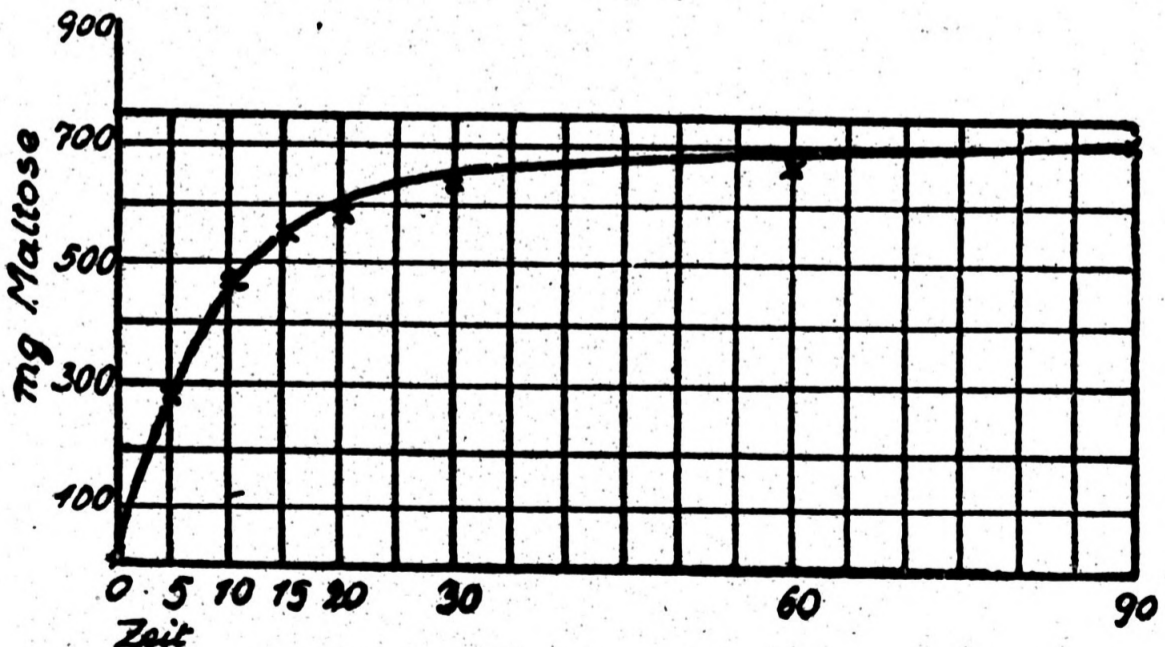


Fig. 4.

Aus der Figur wie aus der Übereinstimmung der Konstanten (Beil. 5) ist ersichtlich, daß die monomolekular gebildete Maltosemenge von dem Ursprung des Enzyms fast



unabhängig, und also eher als eine „Substratkonstante“ aufzufassen ist.

#### Untersuchung der „Nachverzuckerung“.

In einem besonderen Versuch wurde untersucht, ob die Verzuckerung bei der oben gefundenen und wiedergefundenen Ausbeute (75%) überhaupt stehen bleibt oder ob sie langsam bis zur vollständigen Maltosebildung fortschreitet. Nach 3 Tagen wurde dabei (Beil. 6) eine Ausbeute von 886 mg Maltose festgestellt. Dies entspricht einer Verzuckerungsgeschwindigkeit der 31% in den ersten Ausbeuten nicht wiedergefundenen Stärke von rund 1:1000 derjenigen Reaktionskonstante, womit die ersten 69% verzuckert werden<sup>1) 2)</sup>.

#### Einfluß des Alterns der Stärkelösungen auf die Verzuckerungsgeschwindigkeit.

Die in der vorliegenden Arbeit angewandten Stärkelösungen wurden immer kurz vor dem Bedarf bereitet, aufgeköcht und zur Versuchstemperatur (37°) gekühlt. Es wurde aber besonders festgestellt, daß ein „Altern“ der Stärkelösung während der Versuche, etwa durch Änderung der Dispersitätsgrade, keinen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat.

#### Versuchsreihe I: Vorbehandlung bei 37°.

Ehe die Stärkelösung angewandt wurde, wurde sie während 5 Stunden durch Phosphatzusatz (25 ccm 2%ige Stärkelösung, 1 ccm 0,29 mol. Phosphat) bei den folgenden Aciditäten „vorbehandelt“.

p<sub>H</sub>: 4,3    6,3    6,7    7,2    8,6.

Sodann wurde die Lösung durch weiteren Phosphatzusatz auf die optimale Acidität der Verzuckerung gebracht und

<sup>1)</sup> Bei der Berechnung ist zu berücksichtigen, daß bei der Hydrolyse der Stärke theoretisch aus 1 g C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> 1,09 g C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> entsteht, 75% Maltose also 69% verzuckerter Stärke entspricht.

<sup>2)</sup> Nach 4tägiger Verzuckerung wurde im Reaktionsgemisch nach Glukose — mit negativem Ergebnis — gesucht.

sämtliche Proben durch dieselbe Enzymmenge bei 37° verzuckert. Die Resultate waren wie folgt:

Blindprobe, unmittelbar nach		Vorbehandlung bei p <sub>H</sub>				
Herstellung verzuckert	4,3	6,3	6,7	7,2	8,6	
k: 0,078	0,075	0,075	0,079	0,077	0,078	

Versuchsreihe II: Vorbehandlung bei 18°.

Die vorherige Versuchsreihe wurde bei Zimmertemperatur reproduziert. Die Verzuckerung (durch 1 ccm dialysierte Lösung 1) wurde wie im vorigen Falle bei 37° und optimaler Acidität ausgeführt.

		Vorbehandlung bei p <sub>H</sub>		
Blindprobe	4,3	6,7	8,6	
k: 0,023	0,023	0,023	0,024	

Versuchsreihe III.

Eine Stärkelösung (2% Trockensubstanz) wurde bei 18° stehen gelassen und von Tag zu Tag untersucht:

Unmittelbar nach	4	24	48	96
der Herstellung	Stunden	Stunden	Stunden	Stunden
k: 0,024	0,023	0,022	0,021	0,020

Es tritt also nur in der letzten Versuchsreihe bei den längeren Versuchszeiten eine schwache Alterungserscheinung ein.

### 3. Feststellung der Wirkungsbedingungen unserer Malzamylase.

#### A. Verzuckerungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Enzymkonzentrationen.

Unter C<sub>2</sub> war festgestellt worden, daß eine Verdoppelung der Enzymmenge beinahe eine Verdoppelung der Zuckerbildungsgeschwindigkeit bewirkt. Da eine genauere Kenntnis der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymmenge für die Definition der letzteren erforderlich ist, wurde diese Abhängigkeit durch Variation der Enzymmenge im Verhältnis 1 : 20 untersucht.

Es wurden bei den folgenden Enzymmengen die entsprechenden Reaktionskonstanten gefunden (Temperatur 37°):

	k	Nr. der Beilage	k : Enzymmenge
2 ccm dialysierte Lösung 1 . .	0,045	7	0,0225
1 ccm " " 1 . .	0,022	8	0,022
0,5 ccm " " 1 . .	0,011	9	0,022
0,2 ccm " " 1 . .	0,0040	10	0,020
0,1 ccm " " 1 . .	0,00164	11	0,0164

Nur bei der Enzymmenge 0,1 ccm fällt der Wert für k : Enzymmenge aus der Reihe. Bei allen Enzymkonzentrationen, die eine Geschwindigkeitskonstante von mindestens 0,0040 erzeugen, ist die studierte Abhängigkeit linear.

### B. Verzuckerungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen.

Es wurden Versuche mit 4%iger, 2%iger und 1%iger Stärkelösung ausgeführt.

Die Versuchslösungen enthielten:

a	b	c
25 ccm 4%ige Stärkelösung	25 ccm 2%ige Stärkelösung	25 ccm 1%ige Stärkelösung
10 ccm Phosphatgemisch (pH 5,6)	10 ccm Phosphatgemisch (pH 5,6)	10 ccm Phosphatgemisch (pH 5,6)
1 ccm dialysierte Enzymlösung 1	1 ccm dialysierte Enzymlösung 1	1 ccm dialysierte Enzymlösung 1
36 ccm	36 ccm	36 ccm

Die Resultate werden in der Tabelle zusammengestellt:

	k	Nr. der Beilage	k · Substratmenge (b = Normalbedingung)
a	0,0115	12	0,023
b	0,022	8	0,022
c	0,044	13	0,022

Wie bei der Rohrzuckerinversion treten also auch hier durchaus lineare Beziehungen zwischen Substratmenge und Spaltungsgeschwindigkeit auf. Wie aus den Beilagen ersichtlich, ist aber die verdünnteste Stärkelösung deshalb für ver-

gleichende Arbeiten ungeeignet, weil der monomolekulare Reaktionsverlauf hier stark modifiziert wird (vgl. Anhang, S. 215 ff.).

### C. Einfluß des Phosphats auf die Verzuckerungsgeschwindigkeit.

Da bei allen Versuchen in dieser Arbeit mit Phosphatgemischen als Puffer gearbeitet wurde, mußte eine etwaige Einwirkung derselben auf die Reaktionsgeschwindigkeit — besonders mit Hinsicht auf die Definition der enzymatischen Aktivität der Präparate — ermittelt werden. Es wurden die folgenden drei Versuche gleichzeitig ausgeführt:

a	b	c
25 ccm 2%ige Stärkelösung	25 ccm Stärkelösung	25 ccm Stärkelösung
10 ccm 0,29 mol. Phosphat (p <sub>H</sub> 5,6)	5 ccm Phosphat	2 ccm Phosphat
1 ccm Lösung 1	5 ccm dest. Wasser	8 ccm dest. Wasser
<u>36 ccm</u>	1 ccm Lösung 1	1 ccm Lösung 1
	<u>36 ccm</u>	<u>36 ccm</u>

Die Resultate waren wie folgt:

	Nr. der Beilage	Phosphatkonzentration	k
a	18	1 : 12,5 mol.	0,077
b	19	1 : 25 mol.	0,080
c	20	1 : 72,5 mol.	0,075

Die Verschiedenheiten der drei Proben liegen also innerhalb der Grenzen der zufälligen Variationen.

### D. Einfluß von NaCl auf die Verzuckerungsgeschwindigkeit.

Es wurde untersucht, ob die Malzamylase durch Zusatz größerer Mengen NaCl aktiviert werden könne.

a	b	c
25 ccm 2%ige Stärkelösung	25 ccm Stärkelösung	25 ccm Stärkelösung
10 ccm Phosphatlösung	10 ccm Phosphatlösung	10 ccm Phosphatlösung
1 ccm Lösung 1	1 ccm Lösung 1	1 ccm Lösung 1
	0,5 g NaCl	1 g NaCl
<u>36 ccm</u>	<u>36 ccm</u>	<u>36 ccm</u>

	Nr. der Beilage	Zugesetzte NaCl-Konz.	k
a	21	0	0,080
b	22	0,24 mol.	0,086
c	23	0,47 mol.	0,089

Die tatsächlich beobachtete Aktivatorwirkung ist also sehr klein.

#### E. Einfluß anderer Anionen.

Bei der im Kap. 2 beschriebenen weitgehenden Reinigung der Amylaselösung durch Dialyse trat eine wesentliche Schwächung des Enzyms ein. Daß dies nicht auf die Entfernung von Chlorid-, Sulfat- oder Nitrationen beruht, geht aus der folgenden Versuchsreihe hervor. Da sämtliche Versuche in Phosphatlösungen ausgeführt werden, sind die Phosphationen bereits als Erklärungsgrund ausgeschlossen.

Die Versuche wurden mit demselben Reaktionsgemisch wie die vorigen ausgeführt. Temperatur 37°, Enzym: 1 ccm dialysierte Lösung 1.

	Nr. der Beilage	k
1 g KCl	24	0,024
1 g K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25	0,026
1 g KNO <sub>3</sub>	26	0,022
Ohne Zusatz	8	0,022

#### F. Aciditätsbedingungen.

Daß die Acidität die Wirksamkeit der Amylase beeinflusst, ist von vielen Forschern beobachtet worden; man findet eine gute diesbezügliche Literaturzusammenstellung bei Sherman und Thomas<sup>1)</sup>, welche sich selbst experimentell mit dieser Frage beschäftigt haben.

Es wurden bei Anwendung des Phosphatpuffers eine Reihe Versuche bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen

<sup>1)</sup> Sherman und Thomas, Journ. Amer. Chem. Soc. Bd. 37, S. 623 (1915).

ausgeführt. Außer Sherman und Thomas hat auch Adler<sup>1)</sup> die Aciditätsfunktion der Malzamyrase gemessen. Das von Adler für Malzdiastase gefundene Optimum lag bei  $p_H$  4,7 bis 5,15 (bei 20°). Wir haben unsere Versuche teils zur Kontrolle der früheren ausgeführt, teils um denjenigen Kurvenast aufzeichnen zu können, welcher für jede Acidität die relative Menge freien Enzyms darstellt, was nach dem vorigen Kapitel durch Berücksichtigung der Reaktionskonstanten möglich ist.

Die bei den verschiedenen Aciditäten gefundenen Geschwindigkeiten werden in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

$p_H$	k	Relat. k (k bei $p_H$ 5,6 gleich 100 gesetzt)	Nr. der Beilage
Versuchsreihe I.			
5,2	0,064	94	27
5,6	0,068	100	28
6,0	0,062	91	29
6,4	0,063	93	30
6,8	0,056	82	31
Versuchsreihe II.			
5,6	0,064	100	32
6,8	0,058	91	33
7,1	0,049	77	34
7,3	0,043	67	35
7,7	0,035	55	36
Versuchsreihe III.			
4,2	0,063	81	37
5,0	0,078	100	38
5,6	0,078	100	39
8,0	0,025	32	40
8,6	0,008	10	41

Die Werte der relativen k sind in der Fig. 5 mit den entsprechenden  $p_H$ -Werten graphisch dargestellt worden. Die kleinen Vierecke sind die Dissoziationsreste, welche aus einer Dissoziationskonstante gleich  $10^{-7,75}$  zu berechnen sind. (Siehe

<sup>1)</sup> Adler, Biochem. Zeitschr. Bd. 77, S. 146 (1916).

untenstehende Tabelle.) In Fig. 6 ist die Dissoziationsrestkurve gezeichnet und die experimentellen Punkte markiert.

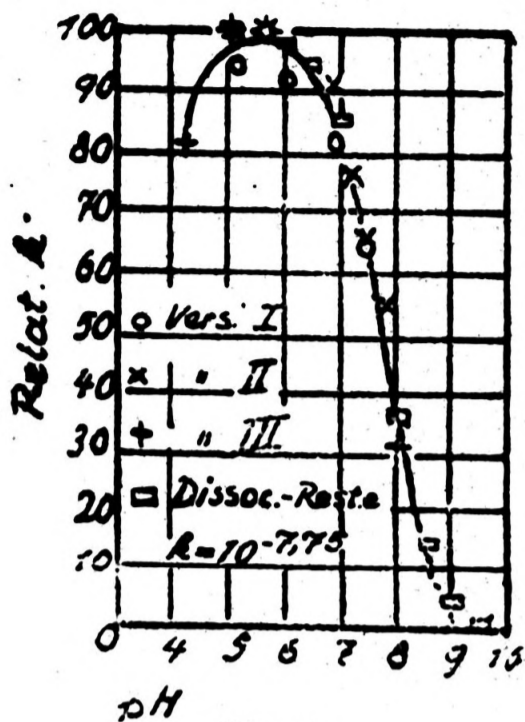


Fig. 5.

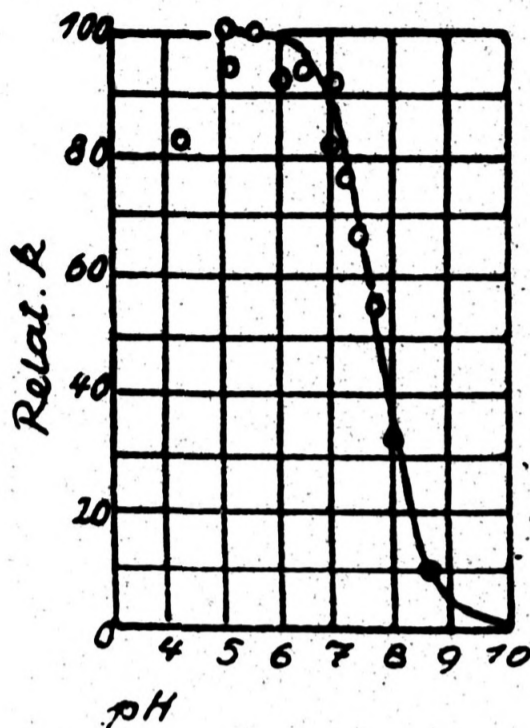


Fig. 6.

Relative Dissoziationsreste  
einer Säure von  $K = 10^{-7,75}$

pH	Dissoziationsrest
5	100
5,5	99,4
6	98,4
6,5	94,9
7	85
7,5	64
8	36
8,5	15
9	5,3
9,5	1,75
10	0,56

Die rechte Seite der Kurve ist also in diesem Falle besser als bei der Speicheldiastase mit Michaelis' Theorie vereinbar<sup>1)2)</sup>, nach welcher das Enzym bzw. die Verbindung Enzym-Substrat<sup>3)</sup> als amphoterer Elektrolyt die Aciditätsbedingungen bestimmt.

<sup>1)</sup> Michaelis und Pechstein, Biochem. Zeitschr. Bd. 59, S. 77 (1914).

<sup>2)</sup> Michaelis, Biochem. Zeitschr. Bd. 17, S. 231 (1909).

<sup>3)</sup> Michaelis und Rothstein, Biochem. Zeitschr. Bd. 110, S. 217 (1920).

Was die Ergebnisse früherer Autoren betrifft, so stützt sich der erste exakt angegebene  $p_H$ -Wert, nämlich der von Sørensen<sup>1)</sup>, auf Angaben Fernbachs. Sherman und Thomas, welche als Optimum der Verzuckerung  $p_H = 4,2$  bis 4,6 angeben, haben allerdings einzelne Punkte elektrometrisch gemessen, eine  $p_H$ -Kurve läßt sich aber aus ihren Angaben nicht konstruieren. Adler findet bei 20° nach der kolorimetrischen Methode von Sørensen einen Optimalwert  $p_H = 4,9$ .

Zuletzt wurde auch das Optimum der Amylasewirkung unter Verfolgung der Reaktion mit der Jodfärbung ausgeführt und eine Kurve der relativen Geschwindigkeiten in der Weise ermittelt, daß zu jedem untersuchten  $p_H$  die Zeit bestimmt wurde, welche notwendig war, um den Übergang Blauviolett-Rotviolett in der Jodfärbung hervortreten zu lassen. Die Versuchstemperatur war wie immer 37°, die Versuche wurden in genau derselben Weise wie bei der Bestimmung der Verzuckerung ausgeführt, nur mit dem Unterschied, daß die aus den Versuchskolben herausgeholtten Proben (je einen Tropfen mit einer und derselben Pipette) anstatt mit Sodalösung mit einer ganz verdünnten Jodlösung (etwa 1:200 normal) vermischt wurden. Die Reaktion wurde dadurch abgebrochen und die Farbumschläge konnten gleichzeitig beurteilt werden.

Die Resultate werden in der Tabelle summarisch zusammengefaßt:

$p_H$	Zeit bei dem Umschlag Min.	Relative reziproke Werte	Nr. der Beilage
Versuchsreihe I.			
4,2	14	100	42
5,7	15	94	43
6,8	20	70	44
7,7	23	61	45
8,6	> 27	(< 52)	46
Versuchsreihe II.			
4,2	15	100	47
5,2	15 $\frac{1}{2}$	97	48
5,7	15 $\frac{1}{2}$	97	49
7,1	24	63	50
8,6	85	18	51

<sup>1</sup> Michaelis, Biochem. Zeitschr. Bd. 17, S. 231 (1909).



In Fig. 7 sind die relativen reziproken Werte der Zeitbestimmungen zu einer Kurve vereinigt. Das Optimum ist, wie man sieht, nach der Wohlgemuthschen Methode fast übereinstimmend mit dem Optimum der Verzuckerung. Möglicherweise ist das optimale Gebiet nach der sauren Seite hin etwas breiter, als was für die Verzuckerung aus der Fig. 5 hervorgeht.

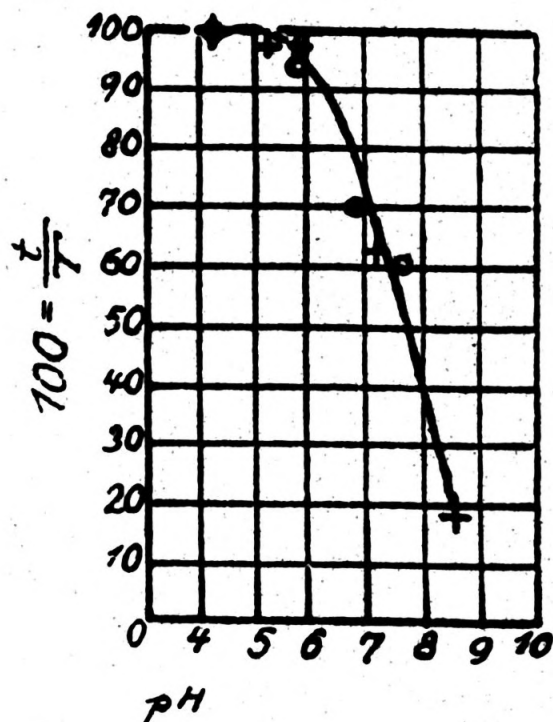


Fig. 7.

Wir können in dieser Hinsicht die Ergebnisse von Adler bestätigen, welche ebenfalls für die Verzuckerung und die nach der Jodmethode gemessene Stärkespaltung noch übereinstimmende Werte fanden, im Gegensatz zu Sherman und Thomas (l. c. S. 634 ff.).

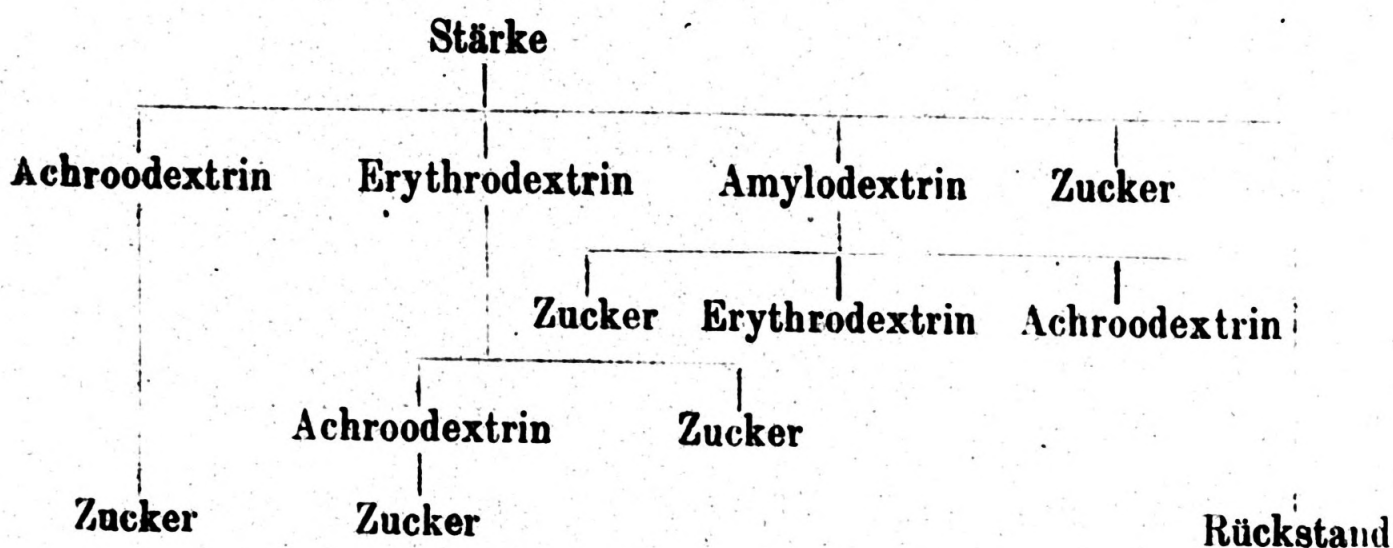
Für jede der beiden Methoden finden wir den Optimalwert der Acidität bei rund  $p_H = 5$ .

### Anhang.

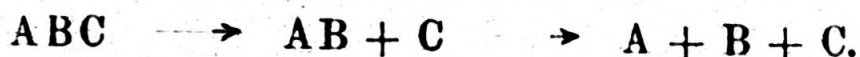
#### Die Abhängigkeit der Gesamtreaktion (Verzuckerung) von den Teilreaktionen.

Im vorhergehenden Abschnitt sind die Verzuckerungsgeschwindigkeiten durch Reaktionskoeffizienten erster Ordnung ausgedrückt worden. Da die theoretische Voraussetzung hierfür nicht ohne weiteres gegeben erscheint, ja im strengen Sinn sicher nicht zutrifft, so bedarf das angewandte Berechnungsverfahren einer Erörterung.

Fassen wir die Stärke als eine Kette von Maltoseresten auf, so stellt sich die Verzuckerung als eine „stufenweise Reaktion“ dar, sei es, daß man annimmt, daß sich von der Reihe der aneinander geketteten Maltosereste der eine nach dem andern löst, sei es, daß man ein Schema wie das von Moreau gegebene zugrunde legt:



In jedem Fall ändert sich im Verlauf des Vorgangs das Substrat, indem das ursprüngliche Substrat verbraucht wird, und neue, als Substrat fungierende Produkte entstehen. Das einfachste Schema eines derartigen komplexen Vorganges ist



Derartige Vorgänge sind schon in größerer Zahl untersucht worden, ihre allgemeine theoretische Behandlung, die man in den Kompendien der physikalischen Chemie findet<sup>1)</sup>, können wir hier übergehen. Unter den älteren experimentellen Beiträgen zur Reaktionskinetik solcher stufenweiser Reaktionen können hier diejenigen von Hjelt<sup>2)</sup> und von Knoblauch<sup>3)</sup> genannt werden, welche die stufenweise Verseifung der Ester mehrbasischer Säuren betreffen. Den bemerkenswertesten rechnerischen Beitrag hierzu hat Walker<sup>4)</sup> geliefert. Er zeigt, wie übrigens leicht einzusehen ist, daß die Gesamtreaktion sich nur dann durch eine Reaktionskonstante erster Ordnung ausdrücken läßt, wenn die erste Teilreaktion sehr viel (mehr als 100mal) schneller verläuft

<sup>1)</sup> Siehe z. B. Ostwald, Allg. Chem. 2, 2, 278 (1896—1902).

<sup>2)</sup> Hjelt, Ber. d. d. chem. Ges. Bd. 29, S. 1864 (1896).

<sup>3)</sup> Knoblauch, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 26, S. 96 (1898).

<sup>4)</sup> Walker, Proc. Roy. Soc. Edinburgh (1897/98), 22.

als die folgende<sup>1)</sup>. Die Reaktion II bestimmt dann den zeitlichen Verlauf des Gesamtvorganges.

Der Umstand, daß bei der enzymatischen Verzuckerung die Reaktionskoeffizienten erster Ordnung meist fallend gefunden wurden<sup>2)</sup>, hat mehrfach zu der Annahme Veranlassung gegeben, daß der einleitende Teilvorgang, welcher das Ausgangsmaterial spaltet, zur Bildung von Zwischenprodukten (Dextrinen) führt, die einer langsameren Spaltung unterliegen. Eine derartige Annahme ist zuerst von Brown und Gledinning geprüft worden (l. c. S. 392), indem sie mit der gleichen Enzymmenge die Verzuckerung eines Stärkepräparates, das sich in verschiedenen Stadien der Umwandlung befand, unter Einhaltung analoger Verhältnisse vergleichend untersuchten. Das Resultat war negativ, insofern keine erheblichen Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit nachgewiesen werden konnten. Auch Henri van Laer (l. c.) hat ähnliche Versuche angestellt.

Einen nicht zu vernachlässigenden Einfluß auf den Verlauf der Spaltung übt die Bindung des Enzyms an die Maltose aus; die diesbezüglichen Versuche von Wohl und Glimm<sup>3)</sup> verdienen fortgesetzt und weiterbearbeitet zu werden.

Ein näherer Einblick in den Mechanismus der Stärkespaltung, welchen sonst kinetische Messungen gestatten könnten, wird dadurch erschwert, daß noch keine für die Zwischenprodukte charakteristische Reaktion bekannt ist, womit ihre

<sup>1)</sup> Ein biochemischer derartiger Fall, bei welchem sich beide Reaktionen messen lassen, ist die Vergärung von Rohrzucker durch Hefe, wobei die Inversion des Rohrzuckers sehr viel schneller erfolgt als die Hexosenspaltung. Vgl. auch Euler, Öfvers. Svenska Vet. Akad. Förh. (1902) Nr. 4.

<sup>2)</sup> Was die Abweichung des Verzuckerungsverlaufes von der Formel für monomolekulare Reaktionen sowie die Tatsache betrifft, daß die Verzuckerung zunächst nicht vollständig verläuft, so ist mehrfach erwogen worden, ob nicht die Umkehrbarkeit der Reaktion die Ursache ist, bzw. ob nicht die Reaktion bei ihrem natürlichen Gleichgewicht Stärke  $\rightleftharpoons$  Maltose zum Stillstand kommt. Dies ist bei so verdünnten Stärkelösungen, wie sie hier in Betracht kommen (2—3%), nicht der Fall, wie besonders aus den Versuchen von Wohl und Glimm (l. c.) hervorgeht.

<sup>3)</sup> Wohl und Glimm, Biochem. Zeitschr. Bd. 27, S. 349 (1910).

Konzentration im Verlauf der Gesamtreaktion festgestellt werden könnte. Einstweilen bietet die Molekulargröße den einzigen Anhaltspunkt. Biltz<sup>1)</sup> hat versucht, in dieser Weise die Bildung der Zwischenprodukte zu verfolgen; er maß während der enzymatischen Spaltung einer Stärkelösung gleichzeitig die Farbenänderung nach Jodzusatz und die Änderung der Viskosität, welche nach Biltz und Truthe<sup>2)</sup> in direkter Beziehung zum Molekulargewicht stehen soll. Biltz nimmt für die Amylodextrine ein Molekulargewicht von über 10 000 an, für die Erythro-dextrine 6200—7000 und für die Achroo-dextrine etwa 3700. Er schließt aus seinen Versuchen, daß die „Verzuckerungsgeschwindigkeit der Achroo-dextrine kleiner ist als die der Erythro-dextrine, und diese wieder kleiner als die der Amylodextrine“. Die Natur der Sache bringt es mit sich, daß diesen Schlüssen erhebliche Unsicherheiten anhaften.

Mit einiger Sicherheit läßt sich einstweilen nur der Verlauf der Gesamtreaktion, d. h. der Maltosebildung, mit dem Verschwinden des durch Jod blau gefärbten Ausgangsmaterials und der nächsten Abbauprodukte vergleichen.

In einigen Versuchen haben wir feststellen wollen, ob das erste Stadium der Reaktion das Endresultat beeinflussen kann, oder ob die Stärke so schnell verbraucht wird, daß diese einleitende Reaktion — wie bei der Vergärung des Rohrzuckers durch Hefe — auf die Bildungsgeschwindigkeit des Endproduktes ohne Einfluß ist. Es wird der folgende Auszug hier mitgeteilt (Beil. 52):

Minuten	Jodfärbung	mg Maltose
10	blau	118
15	blauviolett	—
18	blauviolett	—
21	rotviolett	210
24	rotgelb	—
27	gelbrot	—
30	gelb	279
60	farblos	286

<sup>1)</sup> Biltz, Chem. Ber. Bd. 46, S. 1532 (1913)

<sup>2)</sup> Biltz und Truthe, Chem. Ber. Bd. 46, S. 1377 (1913).

Das Verschwinden der Stärkereaktion (und der Amylodextrinreaktion) tritt also erst ein, nachdem etwa 75% der schließlich entstehenden Maltose gebildet sind. Dies läßt die Annahme zu, daß die ersten Teilreaktionen des Stärkeabbaues mit Geschwindigkeiten verlaufen, die sich wenig von denen der folgenden Reaktionen unterscheiden, wenn man von der langsamen „Nachverzuckerung“ absieht (vgl. S. 207).

### III. Definition der enzymatischen Wirksamkeit von Amylasepräparaten.

#### A. Die neue Einheit der Verzuckerungsfähigkeit, Sf.

Wir haben in früheren Arbeiten die Wirkungsfähigkeit von Saccharasepräparaten (If) in folgender Weise ausgedrückt:

$$\text{If} = \frac{k \cdot g \text{ Rohrzucker}}{g \text{ Präparat}}$$

Innerhalb genügend weiter Grenzen der Substrat- und Enzymkonzentration läßt sich in dieser Weise die enzymatische Wirksamkeit festlegen<sup>1)</sup>. Es ist leicht einzusehen, daß es vorteilhaft wäre, auch die Wirksamkeit von Präparaten anderer Enzyme auf ein analoges, rationelles Maß, statt auf willkürlich gewählte Einheiten zurückzuführen. Es wäre dies wünschenswert, nicht allein aus dem praktischen Gesichtspunkt, ein einheitliches Maß für die Wirksamkeit in die Enzymologie einzuführen, sondern besonders deswegen, weil der Vergleich der für jedes Enzym so gemessenen rationellen Maßeinheiten einen Einblick in die relative Reaktionsfähigkeit der einzelnen Enzyme und Substrate zu eröffnen verspricht.

Aus dem Zahlenmaterial des vorigen Kapitels geht nun hervor, innerhalb welcher Grenzen man die Wirksamkeit von Amylasepräparaten in derselben Weise bestimmen kann, wie dies bei Saccharasepräparaten geschehen ist, nämlich durch eine Konstante, welche den Trockensubstanzgehalt der Enzymlösung (bzw. des Präparates), die verzuckerungsfähige Substratmenge und die Reaktionsgeschwindigkeit  $k$  bei definierter Temperatur und Acidität der Lösung enthält.

<sup>1)</sup> Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 201 (1919).

Bezeichnen wir mit  $k$  die monomolekulare Verzuckerungskonstante, mit „g Maltose“ die Anzahl g Maltose, welche bei der durch  $k$  gemessenen Reaktion gewonnen werden kann, und mit  $g$  Präparat die Menge Enzympräparat, welche im Gesamtvolum der Reaktionsflüssigkeit gelöst wurde, so erhalten wir folgenden Ausdruck für die Wirkungsfähigkeit eines Diastasepräparates hinsichtlich der Maltosebildung Verzuckerungsfähigkeit pro g Trockengewicht,  $Sf = \frac{k \cdot g \text{ Maltose}}{g \text{ Präparat}}$

Die Genauigkeit und Brauchbarkeit dieser Definition des Amylasegehaltes geht hervor aus der Konstanz der in der letzten Spalte der folgenden Tabelle angegebenen Werte  $Sf$ , welche aus den an der dialysierten Lösung I bei den verschiedenen Versuchen (vgl. Kap. II) gewonnen worden sind; sämtliche Werte gelten für die Temperatur  $37^{\circ}$  und für  $pH$ -Optimum.

Beil. Nr.	g Stärke	g Maltose	ccm Enzymlösung	g Trockengewicht der Enzymlösung	k Mittel	Sf
14—15	0,5	0,375	1	0,00077	0,024	11,7
7	0,5	0,375	2	0,00154	0,045	10,9
8	0,5	0,375	1	0,00077	0,022	10,7
9	0,5	0,375	0,5	0,000385	0,011	10,7
10	0,5	0,375	0,2	0,000154	0,0040	9,75
12	1,0	0,75	1	0,00077	0,0115	11,2
15	0,25	0,1875	1	0,00077	0,044	10,7

Der Mittelwert von  $Sf$  beträgt 10,8 für das vorliegende Präparat, der mittlere Fehler in einer Bestimmung ist 0,7, also 6% vom Totalwert.

Der so gewonnene Zahlenwert für  $Sf$  ist — solange das Substrat nicht genauer definiert und die Grenze der monomolekularen Verzuckerung nur empirisch festgestellt ist — ein vorläufiger. Er wird sich jedoch bei später gewonnener genauerer Kenntnis über die Amylose und ihre Spaltung ohne Schwierigkeiten umrechnen lassen.

Mit der Konstanten  $k$  geht natürlich die Spaltbarkeit der angewandten Stärke in den Wert  $Sf$  ein. Diese Spaltbarkeit ist, wie schon eingangs (S. 195) erwähnt, nicht für

alle Stärkepräparate, soweit sie sich bis jetzt definieren lassen, gleich. Von zwei in dieser Hinsicht geprüften Stärkepräparaten gab eine käufliche „lösliche Stärke“ eine Reaktionskonstante, welche 87% von derjenigen betrug, welche bei den auf S. 220 zusammengestellten Versuchen zur Anwendung gekommen war.

Eine Stärke, welche bereitet worden war, indem Kartoffelstärke im Autoklaven 2 Stunden bei 120° in 3%iger Lösung erhitzt wurde, wurde mit einer 10% geringeren Geschwindigkeit gespalten als unser Substratpräparat L 1 (vgl. Beil. 16 und 17).

Der Bereich, in welchem die Wirkungsfähigkeit eines Amylasepräparates durch den Wert Sf genau ausgedrückt wird, liegt zunächst zwischen den Substratkonzentrationen 0,25 und 1,0 g Stärke pro 36 ccm, also zwischen Stärkekonzentrationen 0,72 und 2,8% und zwischen Enzymkonzentrationen, welche bei 37°, optimaler Acidität und Anwesenheit eines geeigneten Neutralsalzes die Reaktionskonstanten 0,004 bis 0,08 ergeben (vgl. Beil. 1 und 2); die Konzentration des (Phosphat-)Puffers ist in einem großen Gebiet ohne Einfluß (vgl. S. 210).

#### B. Die älteren Einheiten der Wirkungsfähigkeit von Amylasepräparaten und ihre Umrechnung auf Sf.

Die älteste unter den jetzt noch gebräuchlichen Einheiten der Wirkungsfähigkeit bzw. der „diastatischen Kraft“ eines amylosehaltigen Stoffes stammt von Lintner.

1. Nach Lintner<sup>1)</sup> wird „das Fermentativvermögen einer gefällten Diastase gleich 100 gesetzt, wenn von einer Lösung, enthaltend 0,1 g Diastase in 250 ccm Wasser, 0,3 ccm (also 0,12 mg Diastase) ausreichend waren, in 10 ccm einer 2%igen Stärkelösung bei gewöhnlicher Temperatur und bei 1 Stunde Einwirkungsdauer so viel Zucker zu produzieren, um 5 ccm Fehlingsche Lösung zu reduzieren“.

Nimmt man an, daß 5 ccm Fehlingsche Lösung 0,3682 g

<sup>1)</sup> Lintner, Journ. f. prakt. Chem. Bd. 34, S. 383 (1886).

Maltose entsprechen (vgl. Wirth, Dissertation loc. cit.), so kann man  $k$  aus folgender Überschlagsrechnung ermitteln:

Minuten	$x$	$a - x$	$k$
60	36,82	113,18	0,00205
150	150	—	—

Hieraus berechnet man  $Sf = \frac{0,00205 \cdot 0,150}{0,00012} = 2,55$ .

1000 Lintner-Einheiten  $F$  entsprechen also rund 26 Sf.

2. Osborne<sup>1)</sup> gibt die Wirksamkeit seiner sorgfältig dargestellten und untersuchten Präparate in Lintner-Einheiten an. Sein wirksamstes Präparat entspricht nach Sherman 600 Lintner-Einheiten oder umgerechnet 15 Sf.

3. Effront<sup>2)</sup>, dem man sehr eingehende Versuche über die Wirkung der Amylase verdankt, hat ebenfalls Vorschläge bezüglich der Bestimmung der Wirkungsfähigkeit von Malzinfusen und von Malz gemacht. Er gründet dieselben auf die unter gewissen Bedingungen eintretende Verzuckerung bei 60°. Für die hier berücksichtigten Zwecke dürfte sich ein solches Verfahren nicht eignen, da bei 60° das Enzym nicht mehr genügend stabil ist. Wir beschränken uns deshalb darauf, auf das bekannte Lehrbuch dieses Autors zu verweisen<sup>2)</sup>.

4. Frl. Philoche<sup>3)</sup> hat in ihrer sehr ausführlichen Untersuchung über die Wirkungsweise von Amylasen ein Präparat angewandt, dessen Wirksamkeit sich aus ihren Angaben in unserer Einheit berechnen läßt. Ihre Versuche beziehen sich auf 31,5°. Als Enzympräparat ist „diastase absolue Merck“ verwendet. Aus ihren sehr zahlreichen Versuchsserien haben uns die folgenden zwei (loc. cit. S. 275) zur Umrechnung gedient. Verdünnung des Enzympräparates 1 : 50000, also 0,002 : 100.

<sup>1)</sup> Osborne, Journ. Amer. Chem. Soc. Bd. 17, S. 598 (1895).

<sup>2)</sup> Effront, Die Diastasen, Deutsche Ausg. 1900, S. 212.

<sup>3)</sup> Philoche, Journ. de Chim. Phys. Bd. 6, S. 275 (1908).



2%ige Stärkelösung				1.5%ige Stärkelösung			
Minuten	g Maltose	a - x	k · 10 <sup>4</sup>	Minuten	g Maltose	a - x	k · 10 <sup>4</sup>
41	0,26	1,24	20	35	0,21	0,92	25
75	0,40	1,10	18	68	0,33	0,80	20
110	0,50	1,00	16	105	0,42	0,71	19
166	0,66	0,84	15	150	0,57	0,56	20
∞	1,50			∞	1,13		
			17				21

Es ergibt sich also, wenn man für k den Mittelwert  $19 \cdot 10^{-4}$  und für g Maltose den Mittelwert 1,32 einsetzt,

$$Sf = \frac{0,0019 \cdot 1,32}{0,002} = 1,2.$$

5. Eine Reihe sehr gründlicher und bemerkenswerter Arbeiten über Amylasen verdankt man Sherman und seinen Mitarbeitern, Kendall, Clark und Schlesinger<sup>1)2)</sup>. Sherman hat in diesen Arbeiten eine neue Skala eingeführt und angewandt.

Was die Ausführung der Bestimmung betrifft, so arbeitet er mit 2 g Stärke und schlägt vor, immer bei 40° und 30 Minuten lang zu verzuckern.

Aus den Zahlen der Tabelle (loc. cit. S. 1084) ergibt sich folgende Umrechnung (vorausgesetzt 0,0312 g Enzym)<sup>3)</sup>:

Ca <sub>2</sub> O	Cu	mg Maltose	K	„new scale“
30	26,8	24,2	9,1	—
60	53,5	48,6	18,4	—
100	89,4	82,0	31,2	1000
200	178,0	—	64,3	—
300	268	—	100,0	—

<sup>1)</sup> Sherman, Kendall und Clark, Journ. Amer. Chem. Soc. Bd. 32, S. 1073 (1910).

<sup>2)</sup> Sherman und Schlesinger, Journ. Amer. Chem. Soc. Bd. 37, S. 646 (1915).

<sup>3)</sup> Aus den K-Werten der Tabelle werden die „new scale“-Einheiten durch Division mit der Enzymmenge erhalten.

Minuten	mg Maltose	a — x	k
30	82	1418	0,00080
—	1500	—	—

$$Sf = \frac{0,0008 \cdot 1,5}{0,0000312} = 38,5.$$

1000 Einheiten „new scale“ entsprechen also einem Wert  $Sf = 38,5$ .

In diesem Zusammenhang mag erwähnt werden, daß Sherman und Schlesinger ein hochaktives Amylasepräparat dargestellt haben, dessen Wirksamkeit sie zu 1500 Einheiten der „new scale“ angeben. Dieses Präparat hat also, in der hier vorgeschlagenen Einheit ausgedrückt, die Wirkungsfähigkeit  $Sf = 58$ .

Es würde nun noch erübrigen, die vorstehenden Angaben auf eine einheitliche Temperatur zu reduzieren.

Die bis jetzt vorliegenden Messungen der Temperaturkoeffizienten scheinen hierzu indessen noch nicht vollkommen ausreichend zu sein, um so weniger, als nicht nur der Temperaturkoeffizient  $\frac{k_T + 10}{k_T}$ , sondern auch der Koeffizient A der Arrheniusschen Temperaturformel

$$k_{T_2} = k_{T_1} \cdot e^{\frac{A \cdot (T_2 - T_1)}{2 \cdot T_2 \cdot T_1}}$$

mit steigender Temperatur stark abnimmt.

Dies geht schon aus älteren Bestimmungen von Müller-Thurgau hervor.

Für das Intervall 20—30° liegen anscheinend zuverlässige Angaben von Vernon vor, nach welchen  $k_{t+10} : k_t = 2$  ist.

Henri van Laer fand folgende Quotienten:

$$\frac{k_{35}}{k_{25}} = 2,2 \quad \text{und} \quad \frac{k_{45}}{k_{35}} = 1,4.$$

Für die Reduktion schlagen wir einstweilen folgende Faktoren vor:

$$k_{30} : k_{20} = 2,0 \quad k_{40} : k_{37} = 1,2.$$

Normaltemperatur: Die von uns gewählte Temperatur 37° kann als die physiologische Normaltemperatur an-

gesehen werden, und empfiehlt sich also zunächst für die Untersuchung der Enzyme der höheren Tiere. Auch für die Angabe der Wirksamkeit pflanzlicher Amylasen erscheint sie recht geeignet, da sie nicht weit unter derjenigen Temperatur liegt, bei welcher die Amylase gewöhnlich zur Wirkung gebracht wird, und andererseits bei dieser Temperatur innerhalb der gebräuchlichen Versuchszeiten noch nicht zerstört wird.

Auf die übrigen normalen Wirkungsbedingungen ist bereits S. 221 aufmerksam gemacht worden; wenn zur Herstellung der optimalen Acidität mit Phosphat gepuffert wird, so findet ein erheblicherer Einfluß des Neutralsalzes nicht mehr statt.

Dagegen ist zu bemerken, daß beim Vergleich der Wirksamkeit von Amylasepräparaten bisher von der Mitwirkung von spezifischen Aktivatoren abgesehen worden ist. Es bleibt also einstweilen offen, in welcher Weise eine solche Beeinflussung von Sf in Rechnung gezogen werden muß.

#### IV. Zusammenfassung.

Zur Angabe der Verzuckerungsfähigkeit Sf von Amylasepräparaten wird auf Grund eigener Versuche folgende Einheit vorgeschlagen, welche der früher für Saccharase eingeführten analog ist:

$$Sf = \frac{k \cdot g \text{ Maltose}}{g \text{ Präparat}}$$

Hier bedeutet k den Mittelwert des Reaktionskoeffizienten der monomolekularen Reaktion, nach welcher sich der erste, größte Teil der Verzuckerung vollzieht, g Maltose die Anzahl g Maltose, welche durch diese Reaktion in maximo gebildet werden können.

Es wird vorgeschlagen, den Reaktionskoeffizienten bei 37° und beim Optimum der Acidität zu messen, mit löslicher, vorher gekochter, nach Lintner bereiteter Stärke von Konzentrationen 0,72—2,8% und mit Enzymkonzentrationen, welche unter diesen Bedingungen Reaktionskoeffizienten zwischen 0,004—0,08 ergeben.

Das Optimum der Acidität der Malzamyase wird durch eine Kurve (Fig. 5, S. 213—215) festgelegt; es liegt bei  $p_H = 5$ .

## V. Beilagen.

Nr. der Bei- lage	Minuten	Gebildete Maltose mg	k $\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$	Bemerkungen
1	4	218	0,037	1 g Stärke 1 ccm Lösung 1 (72 ccm) Mittel: 0,044
	8	373	0,037	
	12	504	0,040	
	16	614	0,047	
	20	658	0,046	
	40	714		
	a, extrapol.	750		
2	2	194	0,065	1 g Stärke 2 ccm Lösung 1 (72 ccm) Mittel: 0,078
	4	351	0,069	
	6	505	0,077	
	8	619	0,095	
	10	658	0,091	
	20	723	0,072	
	a	750		
3	1	96	0,059	1 g Stärke 1 ccm Lösung 1 52° (72 ccm) Mittel: 0,060
	2	170	0,056	
	4	320	0,060	
	6	424	0,060	
	15	670	0,065	
	30	707		
	45	739		
a	750			
4	1	100	0,062	1 g Stärke 1 ccm Lösung 1 52° (72 ccm) Mittel: 0,060
	2	183	0,060	
	4	304	0,056	
	6	442	0,064	
	15	667	0,064	
	30	734	0,056	
	45	739		
a	750			
5	5	286	0,043	1 g Stärke 2 ccm Speichel (72 ccm) Mittel: 0,041
	10	468	0,045	
	15	552	0,041	
	20	590	0,037	
	30	643		
	60	679		
	90	717		
a	725			
6	1 Stunde	670	—	1 g Stärke 2 ccm dialysierte Lösung 1 (72 ccm)
	2,5 Stunden	705	—	
	24 "	806	—	
	48 "	871	—	
	72 "	886	—	

Nr. der Bei- lage	Minuten	Gebildete Maltose mg	k $\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$	Bemerkungen
7	2,5	81,9	0,043	0,5 g Stärke 2 ccm dialysierte Lösung 1
	5	149,5	0,044	
	10	251	0,048	
	a	375		
8	5	75,2	0,019	0,5 g Stärke 1 ccm dialysierte Lösung 1
	10	149,5	0,022	
	20	247	0,023	
9	10	81,9	0,011	0,5 g Stärke 0,5 ccm dialysierte Lösung 1
	20	146,5	0,011	
	40	244	0,011	
10	25	68,5	0,0035	0,5 g Stärke 0,2 ccm dialysierte Lösung 1
	50	138	0,0040	
	100	242	0,0045	
11	50	58,5	0,00148	0,5 g Stärke 0,1 ccm dialysierte Lösung 1
	100	119,5	0,00167	
	200	210	0,00178	
12	5	89	0,011	1 g Stärke 1 ccm dialysierte Lösung 1
	10	—	—	
	20	318	0,012	
	a	750		
13	2,5	31,5	0,032	0,25 g Stärke 1 ccm dialysierte Lösung 1
	5	70	0,040	
	10	128	0,050	
	a	188		
14	5	86	0,023	0,5 g Stärke 1 ccm dialysierte Lösung 1
	7	103,5	0,020	
15	10	161	0,024	Mittel: 0,024
	20	265	0,027	
	30	318	0,027	
16	10	134	0,019	0,5 g Stärke 1 ccm dialysierte Lösung 1 Mittel: 0,022
	20	243	0,023	
	30	301	0,023	
	a	375		
17	10	116	0,016	0,5 g Stärke (Myrbäck) 1 ccm dialysierte Lösung 1 Mittel: 0,020
	20	230	0,021	
	30	291	0,022	

Nr. der Bei- lage	Minuten	Gebildete Maltose mg	k $\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$	Bemerkungen
18	3	136	0,065	0,5 g Stärke 1 ccm Lösung 1 10 ccm Phosphat
	6	246	0,077	
	9	316	0,089	
	a	375		
19	3	144	0,070	0,5 g Stärke 1 ccm Lösung 1 5 ccm Phosphat
	6	252	0,081	
	9	316	0,089	
20	3	136	0,065	0,5 g Stärke 1 ccm Lösung 1 2 ccm Phosphat
	6	248	0,077	
	9	309	0,084	
21	3	146	0,071	0,5 g Stärke 1 ccm Lösung 1 ohne NaCl
	6	264	0,088	
	9	306	0,082	
22	3	146	0,071	0,5 g Stärke 1 ccm Lösung 1 0,5 g NaCl
	6	272	0,093	
	9	323	0,095	
23	3	164	0,083	0,5 g Stärke 1 ccm Lösung 1 1 g NaCl
	6	278	0,098	
	9	312	0,086	
24	5	86	0,023	0,5 g Stärke 1 ccm dialysierte Lösung 1 1 g KCl
	10	156,5	0,023	
	20	258,5	0,025	
25	5	90,8	0,024	0,5 g Stärke 1 ccm dialysierte Lösung 1 1 g K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	10	163,5	0,025	
	20	274	0,028	
26	5	74,5	0,019	0,5 g Stärke 1 ccm dialysierte Lösung 1 1 g KNO <sub>3</sub>
	10	150	0,022	
	20	254	0,025	
27	5	196	0,064	0,5 g Stärke 1 ccm Lösung 1 pH 5,2
	a	375		
28	5	203	0,068	5,6
29	5	192	0,062	6,0
30	5	194	0,063	6,4
31	5	178	0,056	6,8
32	5	196	0,064	5,6
	a	375		

Nr. der Beilage	Minuten	Gebildete Maltose mg	$k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$	Bemerkungen
33	5	183	0,058	6,8
34	5	162	0,049	7,1
35	5	147	0,043	7,3
36	5	114	0,031	7,7
36	10	214	0,037	7,7
37	5	194	0,063	4,2
	a	375		
38	5	223	0,078	5,0
39	5	223	0,078	5,6
40	5	95	0,025	8,0
40	10	170	0,026	8,0
41	5	35	0,008	8,6
41	10	61	0,008	8,6

Nr. der Beilage: 42 u. 43

44

45

46

Minuten	42 u. 43	44	45	46
13	Blauviolett	Blauviolett	Blau	Blau
15	Dunkel Rotviolett	"	"	"
18	"	"	Blauviolett	"
21	Rotviolett	Dunkel Rotviolett	"	"
24	"	"	Dunkel Rotviolett	"
27	Hell Rotviolett	Rotviolett	"	"

Nr. der Beilage: 47—49

50

51

Minuten	47—49	50	51
15	Blauviolett	—	—
18	Dunkel Rotviolett	—	—
21	Rotviolett	—	—
24	"	Blauviolett	—
27	Hell Rotviolett	Dunkel Rotviolett	—
30	—	Rotviolett	Blau
75	—	—	—
80	—	—	Blauviolett
85	—	—	Dunkel Rotviolett
90	—	—	"

Nr. der Bei- lage	Minuten	Gebildete Maltose mg	k $\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$	Bemerkungen
52	10	118	0,022	0,43 g Stärke II 1 ccm dialysierte Lösung 1  (Sf = 9,4)
	20	210	0,027	
	30	279		
	60	286		
	a	295		
53	2	247	0,09	1 g Stärke 2 ccm Lösung 2 (72 ccm)
	4	448	0,10	
	6	626	0,13	
	8	654	0,11	
	a	750		
54	4	161	0,061	0,5 g Stärke 1 ccm Lösung 2 20 Stunden Dialyse
	6	224	0,066	
	10	299	0,069	
	a	375		
55	5	194	0,063	0,5 g Stärke 1 ccm Lösung 2 40 Stunden Dialyse
	10	294	0,067	
	a	375		