Wpływ jonów na amylazę roślinną.

(Influence des ions sur l'amylase végétale). [1])

Napisała

G. FLANCERÓWNA.

Sprawa wpływu, jaki wywierają sole, względnie ich anjony lub katjony, na zdolność hydrolityczną amylazy względem skrobi, była i jest dotychczas przedmiotem wielu dociekań i doświadczeń. Pierwsze próby robione w tym kierunku naogół nie dały pewnych ani zgodnych wyników. W jednym wypadku dana sól aktywowała, w innym, w domniemanie tych samych warunkach, sól ta hamowała. Wiele z pośród tych niepowodzeń można położyć na karb mało ścisłych metod, a głównie nieuwzględniania odczynu środowiska, w jakiem próby się odbywały.

Jest obecnie rzeczą znaną i dobrze zbadaną, że działanie każdego enzymu, a więc i diastazy, zależy w decydującym stopniu od koncentracji jonów wodorowych. Działanie danego enzymu może się odbywać w pewnych, nadzwyczaj ciasnych, granicach kwasowości; przekroczenie tych granic powoduje niekiedy zahamowanie reakcji enzymatycznej, lub jej osłabienie.

Niejednokrotnie przy podziałaniu pewnym elektrolitem na diastazę otrzymywano efekt obniżenia jej zdolności hydrolitycznej; wnioskowano stąd wprost, iż dany elektrolit jest paralizatorem dlastazy, nie zwracając wcale uwagi na stężenie wodoro-jonów. Możliwem zaś jest, że dodatek danej soli przesunął ($H^{\cdot}$) środowiska poza optimum i wskutek tego doświadczenie wykazało pozorne hamowanie danej soli. Wynik mógłby wypaść wręcz przeciwnie, gdyby zarówno mieszanina kontrolna, jak i z dodatkiem soli badanej, była utrzymywana w stałem, optymalnem stężeniu jonów wodorowych.

---

[1]) Présenté à la séance de la Soc. Bot. de Pologne, section deVarsovie, le 23. III. 1930.

W pierwszym rzędzie można to powiedzieć o wpływie fosforanów na amylazę. Dawne badania z temi solami dały wyniki niejasne; najczęściej mówiono o hamowaniu przez nie amylazy. Nie uwzględniano wcale różnicy w odczynie między fosforanem I^0 i II^0-rzędowym, ani przesunięć (H·), jakie one wywołują, gdy je dodać do mieszaniny. Dopiero badania nowsze, robione metodami ścisłemi, wyjaśniły znaczenie tych soli dla diastazy.

Dla ścisłości więc badań i dla otrzymania wyników porównalnych ze sobą, doświadczenia powinny być wykonywane przedewszystkiem w jednakowych pod względem (H·) warunkach.

Obecnie istnieje już cały szereg prac w tej dziedzinie, których dane są w wielu punktach zgodne i całkowicie pewne. Dotyczy to w pierwszym rzędzie amylazy zwierzęcej, mniej jednak pomyślnie przedstawia się ta sprawa w dziedzinie amylazy roślinnej. Tutaj dotychczas niema jeszcze zgodności odnośnie do działania poszczególnych soli. Dane poszczególnych autorów są naogół sprzeczne. Prócz tego najczęściej wyniki, jakie dały badania z amylazą roślinną, nie są zgodne z odpowiedniemi wynikami, uzyskanemi na materjale zwierzęcym.

W obecnym stanie wiedzy zagadnienie to jest o tyle rozwiązane, iż przyjmuje się dla amylazy zwierzęcej cały szereg aktywatorów w postaci soli nieorganicznych. W pierwszym rzędzie należą tu chlorki metali alkalicznych i ziem alkalicznych. Dla amylazy roślinnej sprawa ta nie jest jeszcze ostatecznie rozstrzygnięta. Pewna grupa badaczy neguje wszelkie działanie aktywujące soli w stosunku do amylazy roślinnej i ci stoją na stanowisku, iż amylaza zwierzęca i roślinna nie są identyczne, lecz uważają je za dwie odmiany enzymu amylaza i przypisują im dość znaczne różnice. Inni natomiast upatrują w podanych wyżej solach aktywatory zarówno amylazy zwierzęcej, jak i roślinnej, i w tym względzie nie uznają zasadniczej różnicy między temi enzymami.

Zagadnienie to wymaga przeto dalszych jeszcze obserwacyj.

O ile zjawisko hamowania względnie aktywowania amylazy przez sole zostało już w b. wielu wypadkach skonstatowane i technicznie opanowane, o tyle gorzej stoi sprawa z wytłumaczeniem samego przebiegu tych zjawisk. Dotychczas nie można niestety powiedzieć z całą pewnością, na czem zjawisko hamowania lub aktywowania polega, nieznane są procesy chemiczne, czy też fizyko-chemiczne, które mu towarzyszą. Dlatego też wszechstronne, teoretyczne opracowanie tego zagadnienia w obecnej chwili jest trudne.

Istnieją dwie hipotezy, które starają się w możliwie prosty i wiarogodny sposób ująć zjawisko wpływu jonów na enzym diastatyczny. Są to hipotezy Michaelis'a i Biedermanna.

Najbardziej przyjętą i najlepiej tłumaczącą te sprawy jest hipoteza Michaelis'a.

Opierając się na fakcie, że amylaza przedializowana, a więc pozbawiona wszelkich domieszek mineralnych, traci zdolność hydrolizowania skrobi i naodwrót zdolność swą odzyskuje, gdy dodać do niej pewnych soli neutralnych — wypowiada pogląd, że sam enzym amylaza, ściślej mówiąc organiczne podłoże tego enzymu, jest nieczynne; jest jakby zymogenem, który dla przejścia w formę czynną wymaga jakiegoś specyficznego koenzymu. Takim koenzymem dla amylazy mają być pewne sole nieorganiczne, właściwie ich anjony. Z temi solami amylaza tworzy kompleksy elektrolitycznie mniej lub więcej zdysocjowane, przyczem bądź tylko część zdysocjowana, bądź niezdysocjowana, jest enzymatycznie czynna. Jeśli przyjmiemy, że zdysocjowana część jest enzymem, to jego działanie zależy w pierwszym rzędzie od stopnia dysocjacji kompleksu.

Przyjmując tę hipotezę, bardzo prostem staje się wytłumaczenie wpływu, jaki ma zmiana ($H^{\cdot}$) na działanie amylazy. Zmiana ($H^{\cdot}$) przesuwa przedewszystkiem stopień dysocjacji kompleksu enzym-sól, a co za tem idzie zmienia sposób jego działania.

Amylaza może tworzyć kompleksy z całym szeregiem anjonów nieorganicznych, z których każdy wykazuje różny stopień pewnego „powinowactwa" (Affinität) do organicznego podłoża enzymu. Im powinowactwo jest większe, tem silniej dany anjon jest związany z enzymem. Kompleksy różnią się między sobą swoją aktywnością wobec skrobi, przytem niekoniecznie sól o większem „powinowactwie" tworzy bardziej aktywny kompleks. Tak np. ze wszystkich badanych przez Michaelis'a soli $NaNO_3$ najsilniej się z enzymem wiąże, natomiast największą moc hydrolityczną przejawia kompleks amylaza-sól kuchenna. Prócz tego kompleksy różnią się optymalnem stężeniem wodorojonów, przyczem istnieje pewna zależność między „optimum p_h" a stopniem powinowactwa danej soli do enzymu; sole o podobnem powinowactwie mają też te same „optimum p_h".

W zależności od „powinowactwa" i „optimum p_h" Michaelis odróżnia 3 grupy soli:

Azotany } opt. $p_h = 6{\cdot}9$ — największe powinowactwo

Chlorki, Bromki } opt. $p_h = 6{\cdot}7$ — średnie powinowactwo

Siarczany
Octany } opt. p_h = 6·1—6·2 — najsłabsze powinowactwo.
Fosforany

Za hipotezą Michaelis'a, ściślej mówiąc za tem, że czynny kompleks jest elektrolitem, przemawia zachowanie się amylazy podczas dializy elektrycznej. Przemawia za tem fakt podany przez Lisbonne et Vulgain, według których przy dializie elektrycznej wyciągu słodowego płyn, zawierający diastazę a niezawierający żadnych substancyj mineralnych, zebrał się przy biegunie ujemnym; jest więc dodatnio naładowany.

Opierając się na tem, można przyjąć, że rzeczywiście dodatnio naładowany enzym (E) łączy się z ujemnie naładowanym anjonem (A) soli na elektrolitycznie zdysocjowaną całość (K)

$$\overset{+}{E} + \overset{-}{A} = K.$$

Według więc hipotezy Michaelis'a zasadniczym składnikiem jest organiczne podłoże, sole są niezbędne o tyle, iż dzięki nim powstają czynne kompleksy. Żaden ze składników, ani organiczny substrat, ani sól-koenzym, nie może sam wywierać wpływu na skrobię.

Hipoteza Biedermanna, potwierdzona przez badania Haehna, Iljina i innych, jest w zasadzie zgodna z hipotezą Michaelis'a, wprowadza jednak pewne jeszcze punkty nowe.

Zasadnicza różnica między obiema hipotezami polega na roli, jaką obaj autorzy przypisują solom nieorganicznym przy działaniu amylazy. Jak podano już wyżej, Michaelis uważa sole jedynie za komplement względnie koenzym amylazy; właściwą czynną częścią, obdarzoną zdolnością hydrolityczną, jest jedynie część organiczna, sól sama funkcji rozkładowej nie ma, jest ona potrzebna do pobudzenia enzymu do czynności.

Biedermann zgadza się z tym poglądem Michaelisa, potwierdza go nawet w swoich doświadczeniach, przypisuje jednak samym tylko solom nieorganicznym, całkowicie bez udziału enzymu, taką samą w zasadzie zdolność hydrolizy amylozy do cukru. Zdolność hydrolityczna wprawdzie soli jest o wiele słabsza od enzymatycznej, ale jednak i sama sól, coprawda tylko po dłuższym czasie, może spowodować rozkład skrobi na cukier. Proces ten został przez niego nazwany autolizą skrobi.

Według zdolności autolitycznej ustalił następujący szereg soli:

$$KBr > NaCl > KCl > NaBr > CaCl_2 > MgCl_2 > BaCl_2 > SrCl_2.$$

Opierając się na tem, iż autolizę wywołują te same sole, które są z drugiej strony aktywatorami ptyaliny, Biedermann wnioskuje,

iż prawdopodobnie przy autolizie chodzi również o enzym diastatyczny; przyczem przypuszcza, iż powstaje on wtórnie w skrobi pod wpływem soli: „unter Mitwirkung bestimmter Ionen oder Ionengemische aus der im Wasser löslichen Amylose eine, wie ein Ferment wirkende Substanz (eine Amylase) entsteht, die man wohl im Sinne von Michaelis als eine Komplexverbindung eines Bestandteils der Amylose mit den betreffenden Ionen aufzufassen hätte".

Sole nieorganiczne, jak wynika z tego, nietylko pobudzają istniejący już enzym do działania, lecz mogą nawet wywołać jego powstanie.

Autolityczne działanie soli na skrobię wzmaga bardzo dostęp tlenu, podobnie zresztą dostęp tlenu sprzyja także rozkładowi skrobi pod wpływem enzymu.

Biedermann starał się znaleźć mieszaninę soli, któraby możliwie najlepiej autolizę uskuteczniała. Doszedł do wniosku, iż najlepiej działającą kombinacją jest (B. Z. 137. 1923):

$$\text{na } 50\ cm^3\ H_2O \left\{ \begin{array}{l} 0{\cdot}3\ gr\ NaH_2PO_4 \\ 0{\cdot}8\ gr\ Na_2HPO_4 \\ 0{\cdot}5\ gr\ NaCl. \end{array} \right.$$

Biedermann tłumaczy też na tej podstawie inaczej niż Michaelis hamowanie reakcji enzymatycznej przy zakwaszaniu lub alkalizowaniu. Nie polega ono według niego na psuciu lub uszkodzeniu enzymu, lecz raczej na wyłączeniu (Ausschaltung) jonów soli.

Hipoteza Biedermanna została potwierdzona, jak już wspomniano, przez badania Haehna (6). Temu ostatniemu udało się również uzyskać rozkład skrobi do cukru bez udziału organicznej części enzymu, jedynie pod wpływem soli nieorganicznych. Efekt wywołany przez ten środek udało mu się jeszcze podnieść przez dodatek alaniny i leucyny.

Dotychczasowe badania.

Badania nad wpływem soli na amylazę początkowo były robione jedynie na materjale zwierzęcym. Już Nasse (1875) i Chittenden (1882) badali wpływ NaCl na ptyalinę. Dalej Kübel (8) i Grützner (5) podają, że sole mineralne (chlorki, bromki i fluorki Na i K) aktywują, dodane w pewnych koncentracjach, ślinę naturalną. Kübel'a wyczerpujące badania wykazały, iż te same koncetracje soli kuchennej w jednakowych warunkach doświadczenia działają hamująco na słabe roztwory skrobi, a aktywująco na bardziej skoncentrowane.

Narówni z pracami Kübel'a i Grütznera należy postawić pracę Wohlgemuth'a (16). Wykonana była z śliną naturalną nierozcieńczaną i niedializowaną. Skonstatował znów podobnie jak poprzedni badacze aktywujące działanie NaCl; nawet przy dodawaniu ilości bardzo małych aktywacja była bardzo silna — w jednym wypadku 25-krotna. Jako najniższą koncentrację, przy jakiej jeszcze chlorek sodu aktywował, autor podaje 0·00097%.

U Wohlgemutha też po raz pierwszy spotykamy się ze zdaniem, że właściwym czynnikiem aktywującym jest anjon. Cl^- i Br^- działały u niego jednakowo, J^- słabiej, a F^- hamował.

Okazało się, iż nietylko sole nieorganiczne aktywują diastatycznie czynne płyny zwierzęce. Tenże Wohlgemuth (17) wykazał, że surowica zwierzęca jest aktywatorem amylazy zwierzęcej. Przytem uutor stoi na stanowisku, iż działanie aktywujące surowica zawdzięcza nietylko zawartej w niej NaCl, lecz pewnej innej substancji, niewrażliwej na temperaturę wrzącej wody i rozpuszczalnej w alkoholu. Podobne zresztą działanie aktywujące wykazuje nietylko surowica, lecz również limfa i wyciągi z najróżniejszych organów zwierzęcych, jak: mięśni, nerek i wątroby. We wszystkich tych organach autor znalazł pewną substancję również odporną na temperaturę wrzącej wody i rozpuszczalną w alkoholu i jej to właśnie przypisuje zdolność aktywowania. Nie udało mu się natomiast skonstatować żadnego działania tych substancyj na diastazę roślinną.

Koga (9) skontrolował wyniki Wohlgemutha. Działał surowicą i chlorkiem sodu na wyciąg słodu i diastazę „Taka". W żadnym wypadku nie skonstatował wpływu tych substancyj. Natomiast udało mu się w powyższy sposób zaktywować amylazę bakteryjną.

Późniejsze prace były już robione z materjałem uprzednio przedializowanym, gdyż okazało się, iż już zupełnie drobne ilości soli wywierają silne działanie — dla otrzymania więc wyników jasnych trzeba operować materjałem możliwie pozbawionym domieszek mineralnych.

Wszyscy autorzy pracujący z materjałem zwierzęcym podają, iż zawsze po dializie otrzymują płyn zupełnie nieczynny wobec skrobi lub glikogenu. Niezależnie od tego, czy brali ślinę, czy sok trzustkowy, czy sok żołądkowy, czy wreszcie amylazę wątrobową. Przypuszczają zatem, iż płyn przedializowany nie zawiera już soli mineralnych i dlatego właśnie jest nieczynny, dodatek jakiejś drobnej ilości soli działanie hydrolityczne przywraca.

Przedewszystkiem można tu postawić jeden zarzut, mianowicie co do rzekomej całkowitej niezdolności rozkładu skrobi przez prze-

dializowany enzym. Niektórzy badacze (Michaelis i Pechstein, Starkenstein, Bang, Bierry) sami podają, że enzym przedializowany, nawet bez dodatku soli, po pewnym czasie jednak wykazywał ślady hydrolizy skrobi. Prawdziwem wydaje się zdanie Biedermana (1): „In derselben Zeit in der ein normales Organplasma eine bestimmte Diastasewirkung entfaltet, das gleiche jedoch dialysierte völlig unwirksam bleibt". Można więc raczej mówić o silnem osłabieniu enzymu, nie zaś o całkowitym braku czynności hydrolitycznej.

Te fakty nasuwają 2 przypuszczenia:

1. Bądź niemożliwem jest przez dializę usunięcie wszystkich składników mineralnych,

2. Bądź też domieszki mineralne przez dializę istotnie zostają usunięte, ale samo organiczne podłoże amylazy też może skrobię rozkładać.

Pierwsze przypuszczenie wydaje się być bardziej prawdopodobnem. Rzeczywiście nikt z autorów nie podaje żadnego wystarczającego dowodu na to, iż jego wyciąg dializowany jest istotnie wolny od soli mineralnych; są to tylko przypuszczenia oparte na porównaniu z przebiegiem tegoż procesu w innych wypadkach.

Według wszelkiego prawdopodobieństwa związek enzymu z jonami jest natury adsorbcyjnej. Gdyby przyjąć adsorbcję fizyczną, to przez dializę czyli dyfusję powinny się dać usunąć wszystkie zaadsorbowane składniki mineralne. Nie jest jednak wykluczonem, że wchodzi tu również w grę adsorbcja chemiczna. Stojąc na tem stanowisku, można przyjąć, iż pewna część jonów przez dializę nie zostanie usunięta, lecz będzie w dalszym ciągu związana z enzymem. Bang (2), który dializując ślinę jednak całkowitej nieczynności nie osiągnął, wyraża właśnie pogląd że pewna część NaCl mocno związana z enzymem przez dializę oderwać się nie daje. Ta drobna ilość jonów pozostałych po dializie tłómaczyłaby resztki jej działania.

Zpośród licznych badaczy, pracujących z amylazą przedializowaną, należy przedewszystkiem wymienić Bierry. Zawdzięcza się jemu dwa ważne spostrzeżenia. Bierry i Giaja stwierdzili, że sok trzustkowy przez dializę staje się diastatycznie nieczynny. I dalej znajdujemy u Bierry po raz pierwszy wzmiankę o różnicy między zwierzęcą amylazą a amylazą słodową.

W jednej z wcześniejszych swoich prac Bierry wespół z Giają i Henri (3) poddawał dializie sok trzustkowy psa. Dializa przebiegała w woreczkach kolodjowych tak długo, aż osiągnięto stopień przewodnictwa = 0·0002 zamiast 0·012. Sok ten był wtedy nieczynny

wobec skrobi, dodatek NaCl lub wody morskiej przywracał mu jego aktywność. Podobne próby robił autor ten z diastazą słodową. Wyciąg słodowy w taki sam sposób dializował aż do uzyskania stopnia przewodnictwa = 0·000006 i z wyciągiem otrzymanym przeprowadzał podobne próby jak ze zwierzęcym. Okazało się jednak, iż nie występowała żadna różnica w działaniu wyciągu przedializowanego i naturalnego.

Autor przypuszcza wobec tego, że diastazę roślinną nie można przez pozbawienie soli mineralnych pozbawić jej działania. Hypoteza więc Michaelisa, że sole mineralne są niezbędne jako aktywatory dla organicznego podłoża, dałaby się zastosować jedynie do amylazy pochodzenia zwierzęcego.

Takie same wyniki dała następna praca Bierry (4). Tym razem prócz soku trzustkowego badał jeszcze ślinę, sok żołądkowy, amylazę wątroby i wreszcie amylazę zwierząt bezkręgowych. Znów prowadził dializę dopóty, aż płyn dializowany wykazywał stopień przewodnictwa prawie równy przewodnictwu wody chemicznie czystej. Każdy z użytych płynów po dializie był nieczynny wobec skrobi i glikogenu, a dodatek wody morskiej lub soli znów go aktywował. Zpomiędzy soli wypróbowanych przez niego okazało się, iż wszystkie prawie chlorki i bromki alkaliczne i ziem alkalicznyah działają jednakowo dodatnio, zaś siarczany, szczawiany, octany i fosforany są nieczynne. Najlepiej działa NaCl w koncentracji 1%.

To samo autor przerobił z wyciągiem słodowym; znów powtarza, iż żadna z powyższych soli nie zmienia wcale działania wyciągu przedializowanego, jedynie $CaCl_2$ hamuje. Opierając się na tych wszystkich doświadczeniach Bierry wypowiada myśl, że amylaza roślinna i zwierzęca stanowią dwie różne odmiany enzymu amylaza.

W obecnym stanie metodyki doświadczalnej praca Michaelisa i Pechsteina (11) wydaje się być cenniejszą od wyżej podanych, a to dlatego, iż oni pierwsi uwzględniali koncentrację wodoro-jonów i przeprowadzali doświadczenia w jednakowych pod tym względem warunkach, używając odpowiednich, najczęściej fosforanowych buforów. Na czystej, niedializowanej ślinie stwierdzili, że NaCl już w koncentracji $^n/_{10000}$ dostrzegalnie aktywuje; działanie aktywujące potem rośnie, a od $^n/_{1000}$ — $^n/_{20}$ jest jednakowe. Te same doświadczenia z pojedyńczemi solami były robione ze śliną i skrobią poprzednio dializowaną. Autorzy ustalili następujący szereg aktywatorów:

$CaCl_2$, $MgCl_2$, NaCl = KCl, NaBr, NaJ = $NaNO_3$, Na_2SO_4. Ostatnia ta sól wykazywała tylko minimalną zdolność aktywowania, czego ani Bierry ani Wohlgemuth nie stwierdzili.

W tejże samej pracy po raz pierwszy zostały zastosowane mieszaniny kilku soli z pośród poprzednio zbadanych, a mianowicie:

NaCl, NaBr, Na_2SO_4 i $NaNO_3$.

Na podstawie wyników tych doświadczeń autorzy stwierdzili, iż działanie dwóch soli, z których obie aktywują, nie równa się sumie ich działań, lecz otrzymuje się aktywowanie pośrednie, bliższe temu, którego sól jest dana w większej koncentracji. Dodatek NaCl do jakiejkolwiek soli podnosi jej działanie. Jedynie w wypadku $NaNO_3$—NaCl nie wywiera takiego wpływu. Autorzy tłómaczą to tem, iż anjon NO_3 wiąże się bardzo mocno z enzymem i nie pozwala na powiązanie się z nim anjonu Cl. Wobec tego zaś, że kompleks enzym NO_3 działa słabo, mieszanina $NaNO_3$ + NaCl też daje słaby efekt. Przy innych solach jak Na_2SO_4 lub NaBr anjon Cl ma silniejsze powinowactwo do anzymu niż anjony SO_4 lub Br, tworzy się więc głównie kompleks enzym Cl^-, który jest bardzo czynny diastatycznie i dlatego sól kuchenna dodana do Na_2SO_4 lub NaBr ich działanie wzmaga.

Ścisłe badania Preti (13) również wykazały, iż diastaza „Taka" i maltyna, nawet po bardzo długotrwałej dializie zachowują swe działanie amylolityczne.

Prac robionych na materjale roślinnym, głównie na diastazie słodowej, jest o wiele mniej; wiele jednak z nich prowadzi do wniosków niezgodnych z temi, które wyciąga Bierry, Wohlgemuth i inni. Wprawdzie pozornie różnice między amylazą roślinną i zwierzęcą są duże. Już optimum działania amylazy słodowej leży w pobliżu $p_h = 5$, a więc przy reakcji wyraźnie kwaśnej, podczas gdy ptyalina działa najlepiej w środowisku prawie obojętnem, a mianowicie przy $p_h = 6{\cdot}7—6{\cdot}9$. Już jednak amylaza kartoflana zbliża się pod tym względem do ptyaliny, gdyż jej optimum leży w granicach p_h 6—7, a bakteryjna nie różni się wcale od zwierzęcej. Według Oppenheimera należy amylazę bakteryjną uważać za identyczną ze zwierzęcą, słodową za całkowicie odmienną; kartoflana ma stanowić formę jakby pośrednią między amylazą roślinną a zwierzęcą.

Wobec nieznajomości składu chemicznego amylazy, badacze mówią o różnicy między temi enzymami jedynie na podstawie innego zachowania się amylazy roślinnej podczas i po dializie. Jeśli jednak uwzględnić stosunkowo bardzo złożony skład wyciągu słodowego

w porównaniu ze śliną, to prostem się staje, iż wyciąg słodu jest trudniej oczyścić przez dializę niż ślinę. Ten nierówny stopień oczyszczenia może powodować odmienne zachowanie się amylazy słodowej po dializie.

Wychodząc z tego założenia M. Lisbonne i E. Vulguin (10) zastosowali dla oczyszczenia wyciągu słodowego prócz dializy zwykłej, elektryczną. Płyn otrzymany po 10-dniowej dializie zwykłej poddawali dializie elektrycznej przy różnicy potencjałów = 110 volt. Po upływie 10—12 dni dializę przerywali. Po stronie + był zebrany osad o $K = 1 \cdot 10^{-5}$, po stronie — płyn, który stopniowo stawał się coraz bardziej klarowny o $K = 3{,}6 \cdot 10^{-6}$. Płyny po stronie + i — oddzielono od siebie i wykonano niemi doświadczenia. Płyn + był nieczynny wobec skrobi, dodatek elektrolitów nie wpływał nań. Płyn — był również nieczynny wobec skrobi. Dodatek pewnych elektrolitów ($NaCl$, KCl, $CaCl_2$, KNO_3) przywracał mu znaczną część jego działania. Autorzy przypuszczają więc, iż poprzednicy ich otrzymywali na tem polu negatywne wyniki tylko dlatego, że nie operowali nigdy czystą diastazą słodową. Wobec tego wnioskują, że taksamo jak diastaza ślinowa i trzustkowa, również i słodowa nie może rozkładać skrobi przy całkowitym braku elektrolitów. Różnice między temi enzymami są spowodowane więc nie jakąś różnicą w strukturze, lecz przez niecałkowite oczyszczenie.

Również Haehn i Schweigart (7) pracując z diastazą kartoflaną, otrzymali, stosując dializę i ultrafiltrację, sok całkowicie nieczynny wobec skrobi, któremu dodatek $NaCl$ w koncentracji $^n/_{200}$ przywracał w znacznym stopniu zdolność hydrolityczną. Wykazywali pozatem, że następujące sole aktywują sok kartoflany:

$$NaF,\ NaCl,\ KCl,\ CaCl_2,\ BaCl_2,\ MgCl_2.$$

Sama dializa trwająca 10 dni, nie dała nieczynnej diastazy, działanie jej było jednak silnie osłabione.

Starkenstein (15) przytacza również próbę z diastazą roślinną, która potwierdza pogląd Lisbonne'a, Haehna i Schweigarta na amylazę roślinną. Porównywał on działanie:

a) diastazy roślinnej naturalnej,

b) diastazy roślinnej dializowanej,

c) diastazy roślinnej dializowanej + 1% NaCl.

W wypadku diastazy dializowanej stwierdzał zawsze prawie całkowity brak działania niezależnie od ilości zastosowanego enzymu. Diastaza dializowana + 1% NaCl rozkładała skrobię.

W jednej ze swych prac Biedermana badał ptyalinę pod względem wpływu, jaki wywierają na nią sole mineralne. Wyniki jego są zgodne z innymi autorami. Stwierdził nietylko pomocniczą funkcję NaCl, lecz również jej niezbędność przy hydrolizie skrobi przez amylazę. Różnice odnoszą się tylko co do niektórych koncentracyj. W tejże pracy autorowi udało się skonstatować dla maltyny, a więc materjału diastatycznego roślinnego, iż zachowuje się ona tak samo jak zwierzęca. „Taksamo jak ślinowa, tak też amylaza roślinna jest w stanie wolnym od soli „absolutnie" nieczynna i jest „aktywowana" przez sole neutralne zupełnie tak samo, jak ptyalina.

Doświadczenia własne.

W poniższem zestawieniu podaję szereg doświadczeń, wykonanych przeze mnie nad wpływem jonów mineralnych na hydrolizę skrobi przez diastazę słodową. Wszystkie doświadczenia dadzą się ująć w 3 grupy:

I. Wpływ jonów na zwykły, niedializowany wyciąg.
II. Wpływ jonów na wyciąg częściowo przedializowany.
III. Wpływ jonów na wyciąg całkowicie przedializowany.

Metodyka.

Metodyka badań była w każdej z powyższych grup jednakowa. Jako materjału doświadczalnego używano: 1% roztwór skrobi rozpuszczalnej Kahlbauma, który przygotowywano przez ogrzanie skrobi z wodą na łaźni wodnej aż do uzyskania jednolitej, lekko opalizującej zawiesiny.

Czynnikiem hydrolizującym był wyciąg ze słodu, którego sposób przygotowania był poprzednio przeze mnie doświadczalnie zbadany, gdyż szło o otrzymanie wyciągu możliwie najsilniej działającego.

Odważoną ilość słodu (z browaru Haberbuscha i Schielego), zmielonego dwukrotnie, zalewano potrójną, licząc na objętość, ilością wody destylowanej, dolewano 1% toluolu i zostawiano na 24 godz. często skłócając. Po upływie tego czasu, wyciąg był sączony i przesącz użyty do badań. Uprzednio stwierdzano jeszcze, czy otrzymany płyn jest wolny od bakteryj przez zrobienie posiewu na szalce Petriego. To samo robiono ze skrobią. Materjał używano do doświadczeń jedynie wtedy, gdy badanie wykazywało, że jest zupełnie jałowy. Prócz tego skrobia i wyciąg były przechowywane w naczyniach wysterylizowanych.

Obecność bakteryj jest niepożądana z dwóch względów: 1) niektóre bakterje rozkładają skrobię, gdyż same wydzielają diastazę,

2) bakterje żyjąc na danym materjale i zużywając go, zmieniają jego odczyn.

Woda używana do pracy podlegała destylacji w aparacie ze szkła jenajskiego, by możliwie nie wprowadzać składników mineralnych. Stopień rozkładu skrobi stwierdzano metodą Wohlgemuth'a; uważano rozkład za zakończony z chwilą, gdy mieszanina badana, oziębiona, z rozczynem Lugol'a dawała punkt achromatyczny, tj. jasno żółte zabarwienie samego lugolu rozcieńczonego.

I. Doświadczenia z surowym, niedializowanym wyciągiem.

Przygotowano wyciąg słodu w zwykły sposób. Moc jego była: $D\frac{52^0}{3'} = 20$.

200 cm^3 tego wyciągu zalano .1100 cm^3 alkoholu 96% i po upływie 7 godzin sączono. Osad otrzymany ponownie zalano 80 cm^3 wody destylowanej i po 24 godzinach sączono. Otrzymano 88 cm^3 wyciągu o mocy $D\frac{52_0}{3'} = 20$. Biorąc pod uwagę, iż 88 cm^3 przesączu otrzymano z 200 cm^3 wyciągu surowego — wnioskowano, iż przez zalanie alkoholem enzym osłabł prawie trzykrotnie.

Z tak otrzymanym wyciągiem przerobiono doświadczenia na wpływ anjonów i katjonów. Szereg próbówek zawierających każda:

4 cm^3 skrobi 1%,

1 cm^3 $^1/_{1n}$ soli lub wody destylowanej

wstawiono do łaźni wodnej o temperaturze 50^0, po 5 minutach, gdy zawartość próbówek przypuszczalnie zrównała swą temperaturę z wodą w łaźni, dolewano do każdej próbówki 0·2 cm^3 badanego wyciągu słodu. Licząc od chwili wlania, zostawiano je na 5 minut i po upływie tego czasu wszystkie odrazu zostały umieszczone w mieszaninie wody z lodem, by przerwać działanie diastazy.

Tablica I wykazuje rezultat doświadczenia.

Wynika z niego, iż:

Hamują: $HPO_4 > NO_2 > CH_3COO > C_2O_4 > SO_4$.

Aktywują: $H_2PO_4 > Br > Cl$.

W ten sam sposób zostało przerobione doświadczenie nad wpływem katjonów. Wyniki jego podaje tablica II.

Wynika z niego, iż:

Hamują: Mg > Ca > Asparagina > Na.

Aktywują: $NH_4 > K$.

Tablica I.

	Ilość skrobi 1%	Ilość soli 1/1 n	Konc. soli w mieszan.	Ilość diastazy	Czas trwania dośw.	Ilość lugolu	Zabarwienie
NaCl	4 cm^3	1 cm^3	1/5 n	0·2 cm^3	5 *m*	3 krople	czerwone
NaBr	"	"	"	"	"	"	czerwone z odcieniem żółt.
$NaNO_3$	"	"	"	"	"	"	" " " "
$NaNO_2$	"	"	"	"	"	"	fioletowe
Na_2SO_4	"	"	"	"	"	"	ciemno-czerwone
Na_2HPO_4	"	"	"	"	"	"	granatowe
NaH_2PO_4	"	"	"	"	"	"	żółte
$Na_2C_2O_4$	"	"	"	"	"	"	fioletowo-czerwone
$NaCH_3COO$	"	"	"	"	"	"	" "
Woda	"	—	—	"	"	"	czerwone

Tablica II.

	Ilość skrobi 1%	Ilość soli 1/1 n	Konc. soli w mieszan.	Ilość wody	Ilość diastazy	Ilość lugolu	Czas trwania dośw.	Zabarwienie
NaCl	4 cm^3	1 cm^3	1/5 n	—	0·2 cm^3	3 krople	22 *m*	ciemno-żółte
KCl	"	"	"	—	"	"	"	żółte
NH_4Cl	"	"	"	—	"	"	"	jasno-żółte
$MgCl_2$	"	"	"	—	"	"	"	czerwono-fioletowe czerwono-fiolet.
$CaCl_2$	"	"	"	—	"	"	"	czerwono-fioletowe
Asparagina	"	"	"	—	"	"	"	ciemno-żółte
Woda	"	—	—	1 cm^3	"	"	"	żółte

Trzecie doświadczenie z tej serji polegało na porównaniu działania, jakie wywierają te same jony na amylazę słodową i ślinową.

Brano własną ślinę, którą zbierano do wysterylizowanego naczynia. Ślinę potem przez sączenie uwalniano od mucyny i rozcieńczano wodą o tyle, by jej działanie hydrolityczne było równe działaniu używanego wyciągu słodowego. Przebieg doświadczenia był taki sam, jak poprzednio.

Wyniki tego doświadczenia są następujące:

Amylaza ślinowa.	Amylaza słodowa.
Katjony.	
Aktywują: Na, K, NH_4, Mg, Ca.	Aktywują: NH_4, K.
Hamują: Asparagina.	Hamują: Na, Ca, Mg, Asparagina.
Anjony.	
Aktywują: Cl, Br, NO_3.	Aktywują: Cl, Br, NO_3, H_2PO_4.
Hamują: HPO_4, H_2PO_4, C_2O_4, CH_3COO, SO_4, NO_2.	Hamują: HPO_4, NO_2, CH_3COO, C_2O_4, SO_4.

II. Doświadczenia z wyciągiem dializowanym.

Doświadczenia grupy II-ej i III-ej były już robione z wyciągiem dializowanym, gdyż sole mineralne zawarte w wyciągu surowym, zacierają wpływ soli dodanych.

Dializa przebiegała w woreczkach kolodjowych. Woreczki musiały być sporządzone w ten sposób, by możliwie prędko dyfundowały sole mineralne, a nie przechodziły białka i zaadsorbowany przez nie enzym.

Po bardzo licznych próbach ustalono następującą technikę wytwarzania woreczków do dializy. Celoidynę Scheringa pokrajaną drobno należy suszyć przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu rozpuszcza się celoidynę w alkoholu i eterze w następującej proporcji:

3 *gr* celoidyny,
45 *gr* = 68 cm^3 eteru,
15 *gr* = 18 cm^3 alkoholu 96%

i zostawia się w zamkniętej kolbie, przy częstem skłócaniu dopóty aż powstanie jednolita ciecz.

Woreczki sporządzano przez wlewanie i wylewanie roztworu kolodjum do wnętrza próbówki o odpowiednich wymiarach. (Dla szybszego przebiegu dyfusji pożądane jest, by powierzchnia woreczka była jak największa, dlatego użyto próbówek wąskich a długich). Próbówkę napełnioną kolodjum po brzegi wylewano, poczem ustawiano do góry dnem, na tak długo, aż nie było czuć zapachu eteru, a tylko zapach alkoholu. (Od stopnia wysuszenia woreczka zależy w znacznej mierze jego przepuszczalność). Wówczas powtarzano tę

samą operację dziesięć razy. Ostatni raz zostawiano próbówkę na tak długo, aż przyjmowała ona białą barwę. Wtedy dopiero woreczek był gotów; po wyjęciu go z próbówki umieszczano go w naczyniu z wodą destylowaną, by wypłukać resztki alkoholu i eteru. W wodzie woreczki zostawały aż do użycia. Naczynie z woreczkami należy trzymać w niskiej temperaturze, by zapobiec pęcznieniu, gdyż po napęcznieniu stają się w większym stopniu przepuszczalne.

Każdy otrzymany woreczek przed użyciem do dializy wypróbowywano, czy nie przepuszcza diastazy i czy dostatecznie szybko dyfundują przezeń sole. W tym celu badano, czy woda otaczająca woreczek, hydrolizuje skrobię i czy wzrasta w niej zawartość popiołu. Dializa odbywała się w dużych szklanych cylindrach pojemności 2·5 litra. Dwa woreczki, zawierające razem około 50 cm^3 wyciągu słodowego, były zawieszane na pałeczce szklanej, woda nazewnątrz dochodziła do tego samego poziomu, co płyn w woreczkach. Początkowo zmieniano wodę otaczającą dwa razy dziennie, później stosowano stały przepływ wody przez naczynie. Woda używana do dializy była, podobnie jak i przy innych czynnościach, destylowana w aparacie ze szkła jenajskiego. Bardzo ważnem jest, by w wyciągu dializowanym nie rozwinęły się bakterje; w tym celu zarówno wodę nazewnątrz, jak i wyciąg w woreczkach zalewano tolnolem aż do nasycenia. Woda dopływająca też zawierała tolnol, a zawartość woreczków codzień wylewano i silnie skłócono nanowo tolnolem. Po ukończeniu dializy badano przez posiewy, czy wyciąg jest jałowy i tylko w tym wypadku używano go do doświadczeń [1]).

Na początku dializy zazwyczaj zwiększa się ilość płynu w woreczkach, naskutek wyrównania koncentracji między zawartością woreczków a cieczą otaczającą. W biegu dializy następowało też częściowe wyparowanie płynu w woreczkach. W każdym wypadku porównywano objętość płynu, otrzymanego po dializie, z objętością przed dializą i wprowadzano odpowiednią poprawkę.

W kilku wypadkach płyn po dializie był bardziej kwaśny, niż przed dializą. Dializa odbywała się zawsze w termostacie o temperaturze około 30^0, by przyspieszyć dyfuzję.

Wyciąg przedializowany przedstawia całkowicie bezbarwną, mętnawą ciecz o stopniu przewodnictwa bardzo małym. Zawartość popiołu w nim jest 100 razy mniejsza, niż w wyciągu surowym.

---

[1]) Należy zaznaczyć, iż nawet najstaranniejsze nasycenie tolnolem nie zapobiegało całkowicie rozwijaniu się bakteryj. W niektórych wypadkach posiewy dawały kolonje i wtedy uprzednio sprawdzano, czy wyrosłe bakterje wytwarzają diastazę, czy też nie. Tylko w tym ostatnim wypadku materjał dalej używano.

Ilość popiołu w wyciągu surowym wynosiła 0·34%
„ „ „ dializowanym „ 0·003%

Wyciąg uważano za przedializowany, gdy mieszanina: 4 cm^3 skrobi 1% i 0·2 cm^3 wyciągu dializow. w temperaturze 30° po 48 godzinach nie wykazywała w próbie jodowej żadnego rozkładu skrobi.

Badano wpływ temperatury na przebieg dializy, a mianowicie przy 10, 19 i 36° C. Jakichkolwiek jednak różnic w przebiegu dializy w tych temperaturach nie dało się uchwycić.

A) Wyciąg częściowo przedializowany.

Przygotowany wyciąg słodu w ten sam sposób, co poprzednio, poddano dializie.

Ilość wyciągu dializowanego = 50 cm^3
Ilość wody do dializy = 5 litrów

Po dwudniowej dializie wyciąg, po uprzedniem stwierdzeniu, iż jest jałowy, użyto do doświadczeń.

Doświadczenia odbywały się w ten sposób, iż 5 próbówek, zawierających mieszaninę skrobi i wyciągu + sól i 5 próbówek z takąż mieszaniną i odpowiednią ilością wody zamiast soli, umieszczano w termostacie wodnym w temperaturze 52—53° i co pewien czas pipetą, znajdującą się w każdej z próbówek, pobierano małe próbki celem stwierdzenia stopnia rozkładu skrobi.

Przestrzegano przytem, by próbki były równe i dodawano do nich zawsze tę samą ilość roztworu Lugola. Dla uniknięcia błędu przy dolewaniu małych ilości soli, odmierzano zawsze z tej samej pipety określoną ilość kropel.

Zawartość próbówek:

4 cm^3 1% skrobi,
5 cm^3 wody destylowanej,
5 kropel wyciągu słodowego (około 0·2 cm^3),
3 krople $^1/_{1n}$ soli (około 0·1 cm^3) względnie wody,

koncentracja więc soli w mieszaninie była = $^1/_{100n}$.

Badano wpływ następujących soli:

$NaCl$, KCl, NH_4Cl, $LiCl$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $BaCl_2$.

Przyczem wynik był następujący:

$NaCl$, KCl, NH_4Cl } nie działają,

$LiCl$, $MgCl_2$ } hamują,

$CaCl_2$, $BaCl_2$ } bardzo słabo aktywują.

Z tymże wyciągiem częściowo przedializowanym przerobiono także doświadczenie nad wpływem $FeCl_3$ na działanie diastazy. Zbadano cały szereg koncentracyj. Doświadczenie przebiegało w sposób taki sam, jak przy badaniu wpływu chlorków metali lekkich.

Okazało się, iż działanie $FeCl_3$ zależy od koncentracji i przechodzi od hamowania do aktywowania. Wyniki tego doświadczenia są podane niżej; identyczne doświadczenie powtórzono na wyciągu bardziej oczyszczonym.

$^1/_{150\cdot000}$ n — prawie nie działa
$^1/_{180\cdot000}$ „ — działa słabiej, niż $^1/_{20\cdot000}$ n
$^1/_{200\cdot000}$ „ — słabo aktywuje
$^1/_{250\cdot000}$ „ — lekko hamuje
$^1/_{300\cdot000}$ „ — lekko hamuje.

B) Doświadczenia z wyciągiem całkowicie przedializowanym.

Dializę przerywano i wyciąg uważano za nieczynny, gdy 1 cm^3 tego wyciągu dodany do 4 cm^3 1% skrobi przy temperaturze 52° C po dwóch godzinach nie wykazywał jeszcze żadnego rozkładu, lub też, jeśli 0·2 cm^3 wyciągu w 48 godzin nie shydrolizował 4 cm^3 skrobi w temperaturze 30° C. Nie znaczy to, iż ta sama mieszanina nie wykaże rozkładu po czasie dłuższym.

Wobec tego, iż wszystkie podane dotychczasowe próby, nie pozwalają wnioskować na pewno, że użyte w nich sole aktywują diastazę słodową, a co za tem idzie, nie można z nich wnioskować, że brak soli nieorganicznych powoduje nieczynność przedializowanego enzymu — postanowiono sprawdzić, jak wpływa dodatek popiołu badanego wyciągu słodowego do tegoż wyciągu przedializowanego, na jego zdolność hydrolityczną. Jeśli bowiem słuszne jest przypuszczenie, że tracąc składniki mineralne diastaza staje się nieczynną wobec skrobi, gdyż traci swój koenzym, to dodatek popiołu, uzyskanego z tego samego wyciągu, jaki się poddaje dializie, powinien znów

wrócić mu zdolność rozkładania skrobi. Dodając bowiem popiół, dodaje się właśnie cały kompleks składników mineralnych, które przy dializie zostają usunięte, a brak których powoduje ową nieczynność. Błędem byłoby jednak uważać, że dodanie popiołu w ilości odpowiadającej jego zawartości w wyciągu surowym sprowadza wszystko do stanu pierwotnego i, że przez to powstaje wyciąg o takim samym składzie i własnościach, jaki mieliśmy przed dializą. Należy bowiem pamiętęć, że przedewszystkiem przy otrzymywaniu popiołu zachowują się w stanie niezmienionym jedynie katjony, anjony zaś są już inne; wszystkie bowiem prawie sole występują w popiele jako tlenki, podczas gdy w wyciągu były to napewno sole różnych kwasów mineralnych i organicznych. Druga sprawa to kwestja połączenia się popiołu z organiczną częścią enzymu. Nie wiemy czy i w jaki sposób dodany popiół łączy się z enzymem, czy powstaje przytem taki sam kompleks, w jakim diastaza występuje w surowym wyciągu słodowym. Dlatego też nie przypuszczano wcale, iż efekt dodania popiołu będzie całkowity, tj. że wyciąg dializowany z popiołem będzie działał tak, jak wyciąg surowy, spodziewano się jedynie aktywacji w silnym stopniu.

Przygotowano dużą ilość wyciągu słodowego, część jego wzięto do dializy, drugą część zużyto do uzyskania popiołu. Zawartość popiołu w wyciągu surowym była = 0·34%. W doświadczeniach z popiołem dodawano go w takiej ilości, by zawartość jego była równa zawartości w wyciągu niedializowanym.

Wobec tego, iż popiół jest silnie alkaliczny i wskutek tego dodatek jego zmienia bardzo odczyn mieszaniny, zakwaszano go bardzo słabym $^1/_{100}$ n kwasem octowym, aż do otrzymania odczynu takiego samego, jaki miała mieszanina kontrolna, tj. zawierająca tylko skrobię i wyciąg dializowany. Właściwie wobec tego, iż wnioskowano o działaniu wyciągu dializowanego z porównania z wyciągiem surowym; należałoby odczyn zrównać z odczynem wyciągu surowego.

Metodą elektrometryczną otrzymano, iż:

wyciąg surowy ma $p_h = 5·8$
„ przedializowany — $p_h = 5·3 — 6·0$

różnica w odczynie jest więc tak mała, że nie może ona spowodować większej różnicy w działaniu obu wyciągów, wskutek czego wystarczy zrównać wyciąg z popiołem z wyciągiem przedializowanym. (p_h wyciągu przedializowanego nie dało się dokładnie określić, może z powodu braku w nim elektrolitów).

Pierwsze doświadczenie na wpływ popiołu, wykazało jego aktywowanie, lecz stosunkowo słabe.

Przebieg doświadczenia taki sam, jak w poprzednich.

Dwa szeregi próbówek zawierających { 4 cm^3 skrobi 1% / 0·5 cm^3 wyciągu przedial. / 0·5 cm^3 wody wzgl. popiołu

po zrównaniu odczynu mieszaniny z popiołem, z tym, jaki ma mieszanina bez popiołu, umieszczano w termostacie wodnym o temperaturze 52—53° i przez odbieranie małych próbek sprawdzano stopień rozkładu.

Poniższa tablica (III) ilustruje wyniki wspomnianego doświadczenia.

Tablica III.

Czas	Bez popiołu	Z popiołem
67 m.	granatowe	fioletowo-czerwone
2. g. 2 m.	granat-fioletowe	czerwono-fioletowe
3 g. 8 m.	fioletowe	czerwone
3 g. 32 m.	fioletowe	żółto-czerwone
4 g. 15 m.	fioletowe	żółte

Stosunkowo słaby efekt przypisywano temu, że dodanie popiołu do mieszaniny przed samem doświadczeniem zostawia zbyt mało czasu na wymieszanie się enzymu z solami, zawartemi w popiele. Próbowano więc mieszać popiół z wyciągiem dializowanym pewien dość długi czas przed rozpoczęciem doświadczenia (24 godziny) i potem odpowiednią ilość tej mieszaniny dodawano do skrobi. Różnicy w działaniu mieszanin w obydwu wypadkach nie dostrzeżono.

Późniejsze jeszcze doświadczenia w tym samym kierunku wykazały niezbicie, że popiół dodany do wyciągu przedializowanego w takiej ilości, ile go było w surowym wyciągu — silnie go aktywuje.

Czas potrzebny do całkowitej hydrolizych 4-ch cm^3 1% skrobi przez 0·3 cm^3 wyciągu dializowanego jest 5 godz. 23 min.

W tych samych warunkach czas zużyty do dializy tejże ilości skrobi przez tyleż wyciągu dializowanego, lecz z dodatkiem popiołu, wynosił tylko 3 godz. 27 min.

Można więc powiedzieć, że moc hydrolityczna wyciągu dializowanego + popiół do mocy samego wyciągu dializowanego jest jak

323 : 207,

aktywacja wynosi więc 56%.

W dalszym ciągu przerobiono podobne doświadczenia, dodając koncentracje popiołu różne, większe i mniejsze, niż ta, w jakiej popiół się znajduje w wyciągu surowym. Użyto dziesięć różnych koncentracyj mniejszych, zaczynając od normalnej, tj. takiej, jaka jest w wyciągu surowym aż do $^1/_{90}$ zawartości normalnej i dwie koncentracje większe. Koncentracja wyciągu i skrobi wszędzie jednakowa. Przebieg doświadczenia taki sam, jak poprzednio. Wyniki otrzymane podaje tablica (IV) i wykres Nr. 1. Na wykresie dla przejrzystości rysunku podane są nie koncentracje, lecz ich logarytmy.

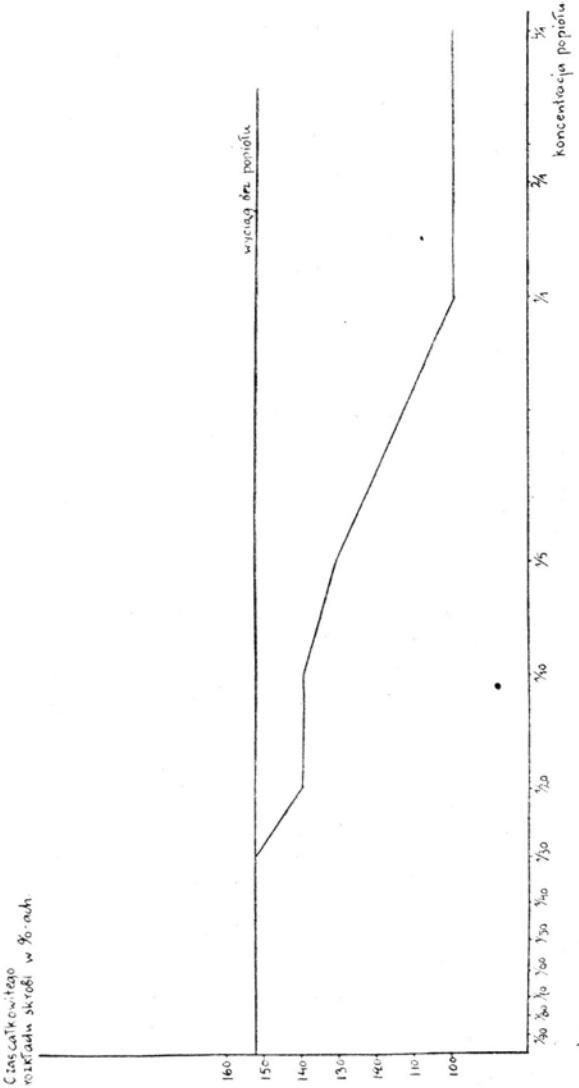
Tablica IV.

	Czas całkowitego rozkładu	Czas całkowitego rozkładu w %-ach
Sam wyciąg	6h 54′	152
Wyciąg + popiół jak w surow. wyc.	4h 32′	100
„ + $^1/_5$ „	5h 56′	131
„ + $^1/_{10}$ „	6h 20′	140
„ + $^1/_{20}$ „	6h 20′	140
„ + $^1/_{30}$ „	6h 54′	152
„ + $^1/_{40}$ „	„	„
„ + $^1/_{50}$ „	„	„
„ + $^1/_{60}$ „	„	„
„ + $^1/_{70}$ „	„	„
„ + $^1/_{80}$ „	„	„
„ + $^1/_{90}$ „	„	„
„ + podwójna zaw. popiołu	4h 32′	100
„ + poczwórna zaw. popiołu	4h 32′	100

Jak wynika z tablicy, najlepiej działa popiół dodany w ilości normalnej, słabiej $^1/_5$ tej koncentracji, jeszcze słabiej $^1/_{10}$, niższe koncentracje, zaczynając od $^1/_{20}$, już żadnego wpływu nie wywierają. Koncentracje większe działają tak samo, jak normalna.

Popiół otrzymany z wyciągu surowego wykazywał sporą zawartość chloru. Wobec tego, iż według wielu autorów specjalnie silne

działanie aktywujące posiada właśnie jon Cl (Wohlgemuth, Bierry), postawiono sobie za zadanie zbadać, czy i w tym wypadku aktywacja przez popiół nie da się sprowadzić do aktywacji przez jon Cl.



Wykres Nº 1. Działanie popiołu w różnych koncentracjach

Należało więc porównać działanie popiołu, zawierającego chlor, z tymże popiołem, pozbawionym chloru. Dla pozbawienia popiołu chloru poddano go długotrwałemu (kilkanaście dni) prażeniu w tyglu platynowym na słabym płomieniu. Otrzymano na tej drodze popiół

prawie pozbawiony chloru (z $AgNO_3$ dawał zmętnienie takie, jakie daje woda wodociągowa). Praktycznie można było przyjąć, iż popiół ten chloru nie zawiera.

Porównano wtedy działanie trzech mieszanin:

1) wyciąg dializowany + woda
2) „ „ + (popiół + Cl)
3) „ „ + (popiół — Cl)

Doświadczenie przebiegało tak samo, jak w wypadkach poprzednich. p_n — w granicach 4·9—5·2.

Tablica V w skróceniu podaje otrzymane wyniki.

Tablica V.

Czas	Bez popiołu	Z popiołem + Cl	Z popiołem — Cl
1^h 4′	czerwone	czerwono-żółte	żółto-czerwone
1^h 40′	żółte	odbarwione	odbarwione
1^h 55′	odbarwione		

Doświadczenie wykazuje, że popiół bez Cl aktywuje w tym samym stopniu, co i popiół z Cl; wskazywałoby to na to, że również katjonom, zawartym w popiele, należy przypisać pewną rolę przy aktywowaniu diastazy, co sprzeciwia się Wohlgemuthowi.

Po skonstatowaniu, iż popiół bezwątpienia aktywuje, zyskano jeszcze jeden dowód na to, że sole mineralne działają aktywująco. Wobec tego przystąpiono do dokładnego zbadania wpływu, jaki na przedializowaną diastazę wywierają pojedyńcze sole mineralne, użyte w różnych koncentracjach. Zbadano wpływ jedynie chlorków metali alkalicznych i ziem alkalicznych, a więc:

$$NaCl,\ KCl,\ NH_4Cl,\ LiCl,$$
$$MgCl_2,\ CaCl_2,\ BaCl_2.$$

W jednem doświadczeniu porównano działanie wszystkich powyższych soli w tej samej koncentracji = $^1/_{100}$ n. W następnych porównano z jednej strony działanie różnych koncentracyj tej samej soli i jednakowych koncentracyj różnych soli między sobą. By uniknąć błędu przy dolewaniu bardzo małych ilości dolewano do każdej próbówki 1 cm^3 odpowiedniej soli. Wszystkie próbówki dopełniano potem wodą destylowaną do tej samej objętości = 10 cm^3. Koncen-

tracja jonów wodorowych w mieszaninach wahała się od 4·9—5·2. Bardziej ciasne granice okazały się zbędne, gdyż w tych granicach zawarte jest optimum działania diastazy, a więc te małe różnice nie wprowadzją różnicy w działaniu mieszanin między sobą.

Poniższa tabela (VI.) i wykres Nr. 2 obrazują wyniki doświadczenia, polegającego na porównaniu działania $^1/_{100}$-normalnych roztworów chlorków alkalicznych i ziem alkalicznych między sobą i z normalną zawartością popiołu. W tablicy podany jest tylko czas zużyty na rozkład całkowity skrobi, w doświadczeniu brane były próbki przeciętnie co 15—20 minut. Dla lepszej orjentacji podano tenże czas w procentach, przyjmując czas zużyty przez wyciąg + popiół za 100.

Tablica VI.

	Czas całkowitego rozkładu skrobi	Czas całkowitego rozkładu w $^0/_0$-ach
Sam wyciąg	6^h 32′	140
Wyciąg + popiół + Cl	4^h 40′	100
„ + popiół — Cl	4^h 40′	100
„ + $^n/_{100}$ $CaCl_2$	4^h 50′	103
„ + $^n/_{100}$ $BaCl_2$	5^h 37′	120
„ + $^n/_{100}$ KCl	6^h 5′	130
„ + $^n/_{100}$ NaCl	6^h 13′	133
„ + $^n/_{100}$ $MgCl_2$	8^h 0′	171
„ + $^n/_{100}$ LiCl	8^h 41′	186
„ + $^n/_{100}$ NH_4Cl	5^h 37′	120

Jak wynika z doświadczenia w tej koncentracji aktywują chlorki Ca, Ba, NH_4, Na, K, hamują — Mg i Li.

Według działania aktywującego możnaby metale te uszeregować w następujący sposób:

$$Ca > Ba > NH_4 > K > Na > Mg > Li.$$

Z wszystkich użytych metali najsilniejsze działanie aktywujące ma Ca; prawie równe popiołowi, potem następuje NH_4 i Ba, dalej K i wreszcie Na.

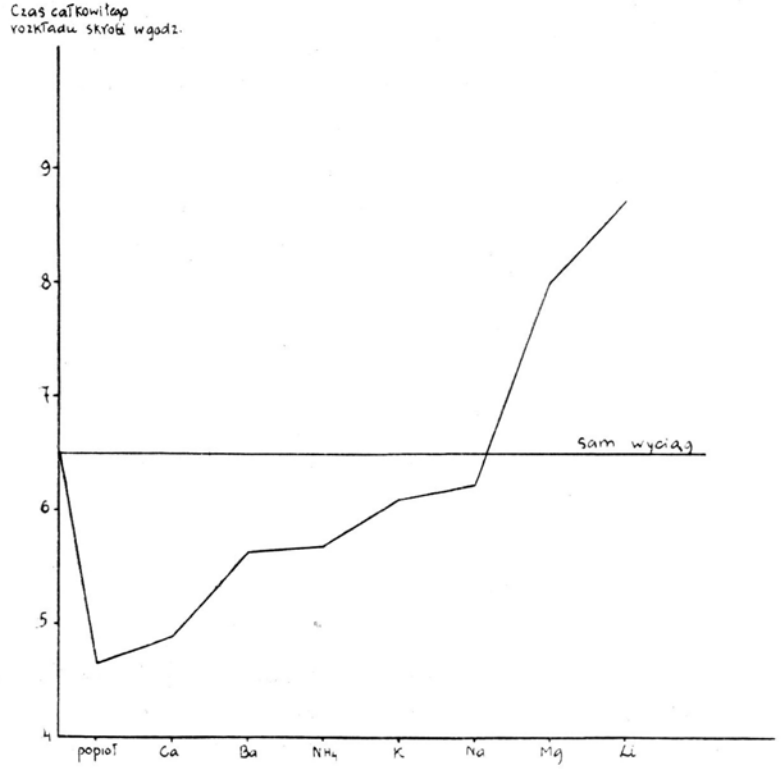
Najsilniej hamuje Li, nieco słabiej Mg. I w tem doświadczeniu wyciąg, zawierający popiół z chlorem i taka sama ilość wyciągu z takąż samą ilością popiołu bez chloru, działają zupełnie jednakowo.

Następuje wreszcie ostatni szereg doświadczeń, mianowicie wszystkie wyżej podane sole zostały zastosowane w różnych koncentra-

cjach, celem znalezienia koncentracyj granicznych w obrębie których aktywowanie zachodzi i znalezienia koncentracji optymalnej.

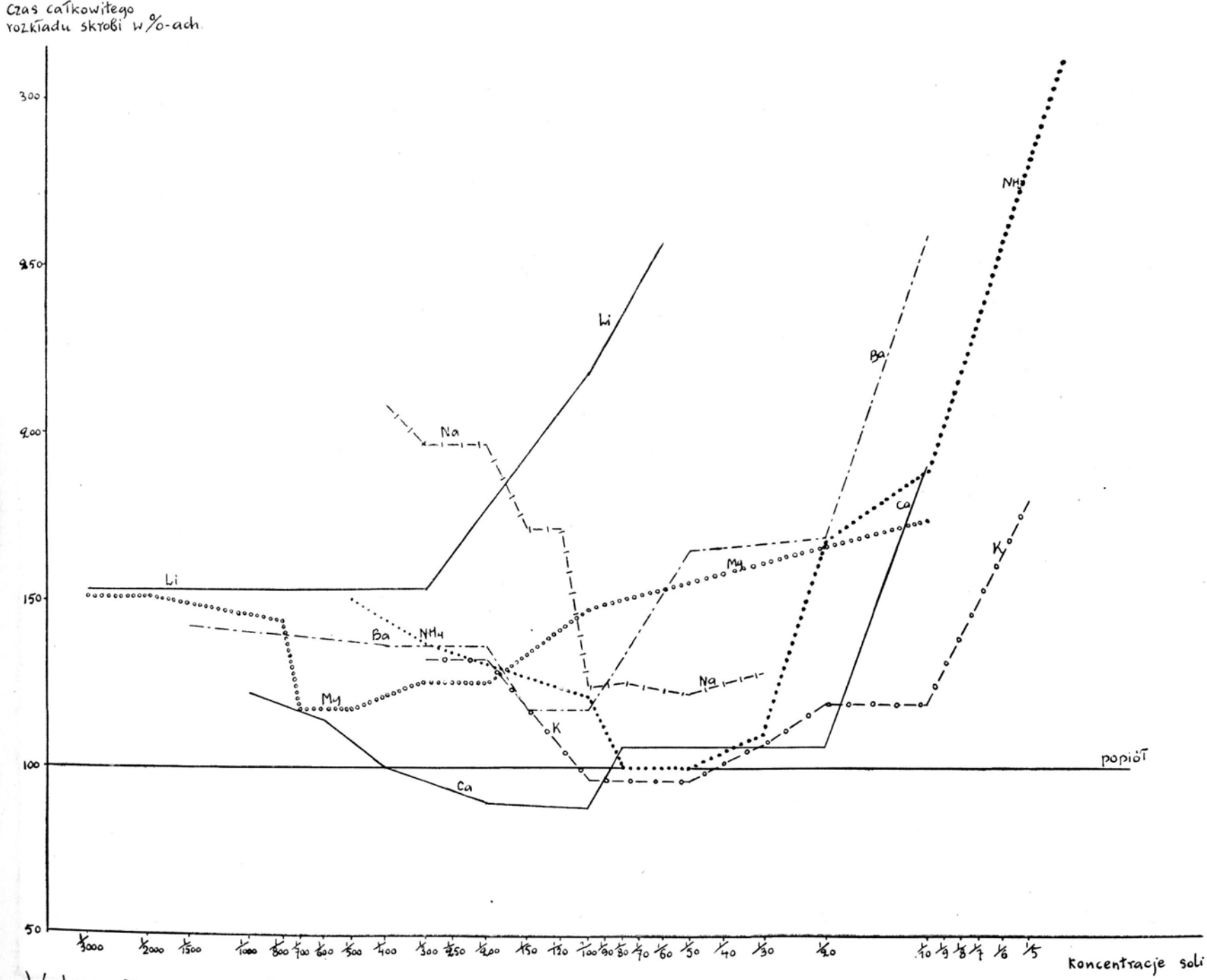
Niżej podana tablica (VII.) i wykres Nr. 3 ilustrują otrzymane wyniki.

Dla wszystkich użytych soli okazało się, iż pewne ich koncentracje, a mianowicie duże, działają hamująco, w mniejszych koncentracjach natomiast aktywują, zaś w jeszcze mniejszych — przestają



Wykres № 2 Działanie wszystkich soli w koncentracji n/100

działać (z wyjątkiem Li, dla którego koncentracji aktywującej wogóle nie znaleziono). Dla chlorków metali alkalicznych (z wyjątkiem Li) optymalne koncentracje leżą w obrębie $^1/_{20}$—$^1/_{100\,n}$, niższe koncentracje działają słabiej, poniżej $^1/_{500\,n}$ przestają działać. Chlorki metali dwuwartościowych mają swe optimum gdzieindziej. Dla Ca między $^1/_{100}$—$^1/_{200\,n}$, dla Ba — też między $^1/_{100}$—$^1/_{200\,n}$, dla Mg — między $^1/_{500}$—$^1/_{700\,n}$.



Wykres № 3. Działanie wszystkich soli w różnych koncentracjach.

Tablica VII.

Na		K		NH_4		Li		Ca		Ba		Mg	
Koncentracja soli w mieszaninie reagującej	Czas hydrolizy w %	Koncentracja soli w mieszaninie reagującej	Czas hydrolizy w %	Koncentracja soli w mieszaninie reagującej	Czas hydrolizy w %	Koncentracja soli w mieszaninie reagującej	Czas hydrolizy w %	Koncentracja soli w mieszaninie reagującej	Czas hydrolizy w %	Koncentracja soli w mieszaninie reagującej	Czas hydrolizy w %	Koncentracja soli w mieszaninie reagującej	Czas hydrolizy w %
1/30 n	128	1/5 n	180	1/5 n	337	1/50 n	257	1/10 n	200	1/10 n	258	1/10 n	174
1/50 „	122	1/10 n	119	1/10 n	189	1/100 n	217	1/20 „	106	1/20 „	169	1/50 „	155
1/80 „	125	1/20 „	119	1/20 „	168	1/300 „	153	1/30 „	„	1/50 „	165	1/100 n	147
1/100 „	124	1/30 „	107	1/30 „	111	1/500 „	„	1/50 „	„	1/100 n	117	1/200 „	125
1/200 „	171	1/50 „	96	1/50 „	100	1/700 „	„	1/80 „	„	1/150 „	117	1/300 „	125
1/500 „	171	1/80 „	96	1/80 „	100	1/800 „	„	1/100 n	88	1/200 „	136	1/500 „	117
1/200 „	196	1/100 „	96	1/100 „	121	1/1000 „	„	1/200 „	89	1/400 „	136	1/700 „	117
1/300 „	196	1/200 „	132	1/200 „	131	1/2000 „	„	1/400 „	100	1/600 „	136	1/1000 „	143
1/400 „	208	1/300 „	132	1/300 „	137	1/3000 „	„	1/600 „	114	1/1500 „	142	1/2000 „	151
popiół	**100**	1/500 „	107	1/500 „	150	popiół	**100**	1/1000 n	122	popiół	**100**	1/3000 „	151
wyciąg	**166**	popiół	**100**	popiół	**100**	wyciąg	**153**	popiół	**100**	wyciąg	**172**	popiół	**100**
		wyciąg	**150**	wyciąg	**148**			wyciąg	**152**			wyciąg	**151**

Na wykresie zamiast bezpośrednio koncentracji soli podane są dla przejrzystości rysunku logarytmy koncentracyj.

Omówienie wyników.

Pierwsze doświadczenie z wyciągiem surowym całkowicie nieoczyszczonym, wykazują jeszcze bardzo dużą różnicę z ptyaliną pod względem działania nań jonów.

Dla śliny wszystkie katjony badane przeze mnie, a więc:

Na, K, NH_4, Mg i Ca

miały działanie aktywujące.

Dla słodu z pośród tych samych katjonów jedynie NH_4 i K aktywowały, wszystkie pozostałe miały działanie wręcz przeciwne, a więc hamowały.

Wyniki te zgadzają się z odpowiedniemi u innych autorów, wszyscy zgadzają się z tem, iż na surowy enzym roślinny sole nie działają, podczas gdy aktywują dostrzegalnie surowy niedializowany enzym zwierzęcy.

Doświadczenia dalsze z wyciągiem częściowo przedializowanym nie wyjaśniły jeszcze stosunku tych soli do diastazy słodowej. NH_4 i K, które poprzednio aktywowały, teraz nie wykazały żadnego działania, natomiast aktywowały Ca i Ba.

Najprawdopodobniej przyczyna tego zjawiska leży w niedostatecznem oczyszczeniu badanego enzymu. Wiadomo, iż wyciąg słodu zawiera znaczną ilość rozmaitych domieszek mineralnych i organicznych. Możliwe, iż te ilości soli, które ekstrakt słodowy zawiera, wystarczają już dla zaktywowania amylazy; dodatek więc soli może bądź nie okazać żadnego wpływu, bądź też nawet zahamować. Dla każdej bowiem soli mineralnej jest słusznem, że jej działanie aktywujące leży w pewnych granicach koncentracji, przekroczenie tych granic zmienia efekt aktywowania na hamowanie (12). Jeśli więc pewna sól zawarta jest w enzymie już w koncentracji optymalnej, to jej dodatek może nie wywrzeć wpływu, jeśli nie powoduje jeszcze przekroczenia optimum koncentracji, bądź zahamować, jeśli spowodował przesunięcie optimum koncentracji poza wartość graniczną.

Stojąc na tem stanowisku, trudno jednak wytłumaczyć, dlaczego to samo nie stosuje się np. do śliny. Ślina surowa już jest aktywowana, biorąc zaś pod uwagę, że i ona zawiera sole mineralne, należałoby się spodziewać takiego samego zachowania się wobec dodatku jonów, jak amylazy roślinnej.

I na tem, zdaje się, polega główna różnica między amylazą roślinną a zwierzęcą.

Po usunięciu składników mineralnych po możliwie najdalej posuniętej dializie różnice te się zacierają. Te same jony, które aktywują ślinę, zaczynają też aktywować diastazę słodu. Wypróbowane przezemnie chlorki:

Na, K, NH_4 Li, Mg, Ca, Ba,

wszystkie, prócz Li, w pewnych koncentracjach aktywowały (zgodnie z danemi dla śliny i soku trzustkowego Bierry, Wohlgemutha, Michaelis'a i innych). Odmienne stanowisko Li pozostaje niewytłumaczonem.

Optymalne koncentracje dla wszystkich katjonów jednowartościowych są zbliżone. Na, K i NH_4 mają optymalne koncentracje między $^1/_{20}$ a $^1/_{100\,n}$.

Podobnie też dla metali dwuwartościowych, Ca i Ba optimum jest $^1/_{100}$—$^1/_{200\,n}$, wyjątkowe stanowisko zajmuje Mg, jego optimum jest przesunięte silnie w stronę koncentracyj słabszych, leży między $^1/_{500}$—$^1/_{700\,n}$. Tem też tłumaczy się, iż porównywując działanie wszystkich powyższych katjonów w koncentracji $^1/_{100\,n}$ otrzymano dla Mg efekt hamowania.

Wynik ostatniego doświadczenia potwierdza pogląd Starkensteina (14), że działanie poszczególnej soli zależy od jej koncentracji i przechodzi od niedziałania przez aktywowanie do hamowania.

Wobec tego też nie można ustalić żadnego stałego szeregu aktywatorów; szereg taki można ustalić jedynie dla pewnej określonej koncentracji, dla innej koncentracji szereg ten zmienia się.

Wyniki odmienne niż w dotychczas wspomnianych badaniach i przytem całkowicie nowe, dały doświadczenia nad działaniem popiołu na wyciąg przedializowany. Przedewszystkiem we wszystkich wypadkach popiół w stopniu b. silnym, bo w 56%, aktywował wyciąg użyty. Wyjaśnia to i charakteryzuje dostatecznie stosunek składników mineralnych do amylazy słodowej. Należy je uważać bezwątpienia za aktywatory tej amylazy, podobnie jak są one aktywatorami amylazy zwierzęcej. Tylokrotnie podkreślany przez Wolgemutha, Bierry i innych fakt, że amylaza roślinna wskutek dializy nie ulega osłabieniu, ani też nie ulega żadnej zmianie przy dodatku soli mineralnych, można wytłumaczyć jedynie jakiemiś błędami metodycznemi i najprawdopodobniej niedostatecznem oczyszczeniem enzymu.

Drugą kwestją jest rola anjonów i katjonów na amylazę.

Według dotychczasowych badań, jak już wyżej wspomniano, jedynie anjon ma zdolność aktywującą, katjony udziału w procesie aktywowania nie przyjmują. Szczególnie silnie ma działać anjon Cl.

Doświadczenia wyżej podane z popiołem zawierającym Cl i pozbawionym Cl zdają się wskazywać na coś wręcz przeciwnego. Okazało się mianowicie, iż popiół bez chloru aktywuje wyciąg przedializowany w tym samym stopniu, co i popiół zawierający chlor. Wskazywałoby to wprost, że również katjony, zawarte w popiele, mają zdolność aktywowania i to w stopniu tak samo silnym, jak Cl. Należy zaznaczyć, że sposób, w jaki usunięto Cl z popiołu, wyklucza możliwość wprowadzenia jakichś innych poza tem zmian w popiele, któreby mogły wpłynąć na jego działanie. Popiół ulegał przez kilkanaście dni prażeniu na b. słabym płomieniu, nie topniejąc wcale, tak, iż nie może być mowy o ulatnianiu poza chlorem i innych składników. Uzyskany w ten sposób popiół wykazywał w próbie z $AgNO_3$ zmętnienie takie, jakie daje woda wodociągowa. Praktycznie więc można go było uważać za pozbawiony chloru.

Za udziałem katjonów w procesie aktywowania przemawia również różnica w działaniu różnych chlorków między sobą. Wszystkie użyte chlorki w równych koncentracjach zawierają wagowo tę samą ilość Cl; pomimo to sole te bardzo różnie działają na diastazę. Jeśli np. weźmiemy $^n/_{100}$ roztór LiCl i takiż roztwór NaCl, to sądząc z jednakowej zawartości w nich chloru i przypisując tylko jemu zdolność aktywowania, powinnibyśmy otrzymać w próbach z temi solami jednakowo silny efekt aktywowania. Doświadczenie wykazuje coś wręcz przeciwnego. Mianowicie NaCl aktywuje, LiCl — hamuje. Różnicę tę można wytłumaczyć jedynie przyjmując, że w grę wchodzi tu jeszcze działanie katjonów Na i Li, które wespół z działaniem anjonu Cl może dawać dodatni lub ujemny efekt. To samo stosuje się do wszystkich pozostałych soli.

Streszczenie.

1. Przez długotrwałą dializę w woreczkach kolodjowych możliwe jest otrzymanie czystej, nieczynnej diastazy słodowej w znaczeniu podanem przez Wohlgemutha, Bierry, Michaelisa i innych dla amylazy zwierzęcej.

2. Tak uzyskana nieczynna diastaza daje się aktywować przez czynniki mineralne.

3. Najlepszym aktywatorem jest popiół z wyciągu użytego do dializy, dodany w koncentracji takiej, w jakiej występuje w wyciągu

normalnym. Działanie aktywujące popiołu zmniejsza się w miarę dodawania ilości mniejszych niż przypadająca na wyciąg surowy.

4. Opierając się na jednakowem działaniu popiołu z chlorem i popiołu bez chloru i na różnem działaniu różnych chlorków, należy funkcję aktywowania przypisywać nietylko anjonowi Cl, lecz również i katjonom.

5. Sole mineralne (chlorki alkaliczne i ziem alkalicznych) prócz LiCl aktywują podobnie, jak popiół enzym roślinny przedializowany. Istnieją pewne koncentracje optymalne dla danej soli; w dużych koncentracjach aktywowanie przechodzi w hamowanie, w koncentracjach słabszych dodatek soli nie wpływa na hydrolizę.

6. Na enzym roślinny w stanie niedializowanym sole mineralne prawie nie działają; ich działanie ujawnia się z chwilą usunięcia zaabsorbowanych przez enzym składników mineralnych.

Pozwalam sobie wyrazić wdzięczność Panu Profesorowi K. Bassalikowi za pobudzenie do podjęcia tej pracy i cenne wskazówki, których mi zawsze chętnie udzielał.

Zakład Fizjologji Roślin Uniwersytetu Warszawskiego.

Bibljografja.

1. Biedermann, W. Das Koferment der Diastasen. Fermentforschung. IV. 258. 1921.

2. Bang, I. Untersuchungen über Diastasen. Biochemische Zeitschrift. 32. 417. 1911.

3. Bierry, H., Giaja et Henry, V. Inactivation amylotytique du suc pancreatique dialisé. Comptes rendus de la Soc. de Biologie. 60. 479. 1906.

4. Bierry, H. Die Rolle der Elektrolyte bei der Wirkung einiger der tierischen Fermente. Bioch. Zeitschrift. 40. 357. 1912.

5. Grützner u. Wachsmann. Über die Einwirkung verschiedener chemischer Stoffe auf das diastatische Pancreasferment. Pflügers Archiv. f. die gesammte Physiologie des Menschen u. der Tiere. 91. 195. 1902.

6. Haehn, H. Abbau der Stärke durch ein System: Neutralsalze + Aminosäuren + Pepton. Bioch. Zeitschrift. 135. 587. 1923.

7. Haehn, H. u. Schweigart. Zur Kenntnis der Kartoffelamylase. Bioch. Zeitschrift. 143. 516. 1923.

8. Kübel. Über die Einwirkung verschiedener chemischer Stoffe auf die Tätigkeit des Mundspeichels. Pflügers Archiv für die gesammte Physiologie des Menschen und der Tiere. 76. 276. 1899.

9. Koga, T. Zur Frage der Differenzierung tierischer und pflanzlicher Diastasen. Bioch. Zeitschrift. 142. 152. 1923.

10. Lisbonne, M. et Vulguin, E. Inactivation de l'amylase du malt par la dialyse electrique. Activation par les electrolytes. Comptes rendus de la Soc. de Biol. 72. 923. 1912.

11. Michaelis, L. u. Pechstein. Die Wirkungsbedingungen der Speicheldiastase. Bioch. Zeitschrift. 57. 77. 1914.

12. Oppenheimer, C. Die Fermente und ihre Wirkungen.

13. Preti, L. Über die Wirkung der Salze auf das Gärvermögen der verschiedenen diastatischen Fermente. Bioch. Zeitschrift. 4. 1. 1907.

14. Starkenstein, E. Über die Fermentwirkung u. deren Beeinflussung durch Neutralsalze I. Bioch. Zeitschrift. 24. 210. 1910.

15. Starkenstein, E. Über die Fermentwirkung u. deren Beeinflussung durch Neutralsalze II. Bioch. Zeitschrift. 47. 304. 1912.

16. Wohlgemuth, I. Untersuchungen über die Diastasen. Bioch. Zeitschrift. 9. 10. 1908.

17. Wohlgemuth, I. Über den Einfluss des Serums, der Lymphe u. der Organpresssäfte auf die Wirkung der Diastase. Bioch. Zeitschrift. 33. 203. 1911.

Resumé.

L'influence de certains ions sur l'action diastatique de l'amylase, a éte étudiée par de nombreux auteurs, tels que: Wohlgemuth, Bierry, Michaelis, Preti et d'autres. Leurs travaux ont montré, que les électrolytes, ou plus exactement leurs anions activent toutes les amylases animales. Les anions Cl, Br et NO_3 agissent le plus énergiquement. L'influence des sels minéraux dépend de leur concentration, chaque sel ayant une concentration optimale différente. Les mêmes auteurs n'ont pu constater l'influence des sels minéraux sur les amylases végétales et considèrent en conséquence, que les amylases végétales et animales ne sont pas indentiques.

Lisbonne et Vulgain, Starkenstein, Haehn et Schweigart et d'autres sont arrivés à d'autres conclusions. En employant des méthodes de dialyse plus éxactes, ils ont pu prouver, que les électrolytes activaient aussi l'amylase végétale. Il n'y a donc d'après eux, pas de différence entre l'amylase animale et végétale.

Nos recherches avaient pour but l'étude de l'influence des sels minéraux sur l'amylase du malt dialysée et non dialysee.

1. On a d'abord comparé l'influence des anions et des kations sur l'amylase du malt non dialysée et sur l'amylase de la salive. Voici les principaux résultats.

Amylase de la salive.	Amylase du malt.
Kations.	
Na, K, NH_4, Mg, Ca activent l'hydrolise.	NH_4, K — activent Na, Ca, Mg — retardent l'hydrolyse.

Anions.

Cl, Br, NO_3 — activent HPO_4, H_2PO_4, C_2O_4, CH_3COO SO_4, NO_2 — retardent l'hydrolyse.

Cl, Br, NO_3, H_2PO_4 — activent HPO_4, NO_2, CH_3COO, C_2O_4, SO_4 — retardent l'hydrolyse.

2. Dans les expériencens suivantes, on a travaillé avec un extrait de malt partiellement dialysé. Les chlorures suivants: NaCl, KCl, NH_4Cl, LiCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $BaCl_2$ ont été employés dans une concentration de $^1/_{100}$ normale. Dans ces conditions:

NaCl, KCl, NH_4Cl — n'agissent pas.
LiCl, $MgCl_2$ — retardent la réaction.
$CaCl_2$, $BaCl_2$ — activent très faiblement.

On a aussi étudié l'influence de $FeCl_3$. Son action dépend entièrement de sa concentration. Dans des concentrations très faibles le $FeCl_3$ active l'amylase, dans des concentrations plus fortes il la paralyse.

3. Les résultats les plus importans ont été obtenus avec un extrait de malt complétement dialysé.

a) Contrairement à ce qu'ont affirmé Wohlgemuth, Bierry, et d'autres, on peut pousser la dialyse de l'extrait de malt jusqu'à, son inactivation complète. L'extrait suffisamment-dialysé, perd la faculté d'hydrolyser l'amidon, tout comme les amylases animales.

b) On a d'abord étudié l'influence de la cendre d'un extrait de malt, sur l'extrait de malt inactif. Les résultats obtenus étaient d'une netteté frappante. La cendre ajoutée a l'extrait inactif lui rendait le pouvoir d'hydrolyser l'amidon. La concentration optimale de la cendre était celle de l'extrait primitif.

C'est une preuve irréfutable, que les sels minéraux activent l'amylase végétale, tout autant que l'amylase animale.

La même cendre dépourvue de chlore, activait l'amylase au même degré que la cendre avec chlore. Cela veut dire que l'influence des kations de la cendre égale celle du Cl. Ce fait contredit l'opinion des auters cités plus haut, d'après lesquels les anions seuls activent l'amylase.

e) Les expériences éxécutées avec les chlorures de métaux alcalins et des terres alcalines ont prouvé, que tous ces chlorures activent l'amylase du malt dialysée, à la seule exception du LiCl. On a pu déterminer pour chaque sel une série de concentrations actives, parmis lesquelles se trouve la concentration optimale. Les con-

centrations plus faibles n'agissent pas, les concentrations plus fortes retardent la réaction.

Les concentrations optimales de tous les chlorures des métaux univalents sont rapprochées, il en est de même pour les chlorures des métaux bivalents. Néanmoins, chaque sel a une concentration optimale propre bien définie. En conséquence, lorsque nous rangeons les chlorures d'après leur influence activante sur l'amylase, le rang obtenu sera différent pour chaque concentration.

Institut de physiologie végétale de l'Université de Varsovie.