G. FLANCERÓWNA.
z Zakładu Fizjologji Roślin U. J. P.

BADANIA NAD NATURĄ AMYLAZY SŁODOWEJ.

(Untersuchungen über die Natur der Malzamylase).

(Wpłynęło 28.VI.1935).

Chemja enzymów jest zagadnieniem żywo interesującem badaczy nieomal tak dawno, jak dawno znane są te czynniki. O jakichś badaniach nad strukturą chemiczną enzymów, może być przedewszystkiem mowa tylko u tych zpośród nich, które bądź to występują w formie t. zw. ektoenzymów, to jest są wydzielane przez komórki lub narządy wydzielnicze ustroju nazewnątrz, względnie u tych, które mogą w stosunkowo prosty sposób sztuczny (przez wyciskanie, ekstrahowanie rozmaitemi rozpuszczalnikami i t. p.), ulec oddzieleniu od struktury komórkowej.

Ale i w tych wypadkach napotyka się na znaczne trudności. Enzym, otrzymany w jakikolwiek z wyżej podanych sposobów, występuje zawsze łącznie z całym szeregiem rozmaitych pod względem chemicznym ciał, które zostały usunięte z komórki wraz z badanym enzymem. Przytem najczęściej z niektóremi zpośród nich enzym jest ściśle związany, czyto przez powinowactwo chemiczne, czy też przez jakąś formę adsorbcji.

Trudność w tym punkcie polega na oddzieleniu enzymu od tych ciał towarzyszących i na stwierdzeniu, którym z nich przypisać rolę składowej części enzymu, a które uważać jedynie za przypadkową, lub przy wyodrębnianiu nieoddzieloną od enzymu, domieszkę.

Nic więc dziwnego, że w kwestji charakteru chemicznego enzymów wogóle, a amylazy w szczególności, nie było i niema dotychczas jednolitego poglądu. Wszyscy dawni badacze stali na

stanowisku, że enzymy, a więc i amylaza, stanowią ciała białkowe z domieszką innych jeszcze ciał, głównie o charakterze węglowodanów. Przez nowszych badaczy hypoteza ta uważana była jednak za błędną. Białko wykrywane w preparatach enzymatycznych, przypisywali oni nie enzymowi, a substancjom towarzyszącym, wyodrębnionym wraz z enzymem z materjału wyjściowego.

Zdawało się, że sprawa ta została definitywnie rozwiązana przez badania Willstaettera i jego szkoły. Udało im się mianowicie, przez zastosowanie adsorbentów o różnej zdolności adsorbcyjnej w stosunku do enzymu i substancji mu towarzyszącej, otrzymać szereg enzymów w postaci preparatów niewykazujących żadnej z ogólnie stosowanych, charakterystycznych reakcyj na białko, a więc według nich pozbawionych białka. Tak więc otrzymali sakcharazę, lipazę, trypsynę, amylazę trzustkową, jako substancje całkowicie wolne od białka i węglowodanów.

Niestety jednak badania Willstaettera, przyjęte pierwotnie przez cały świat naukowy, jako pewnik nie podlegający żadnej już dyskusji, wywołały w ostatnich latach z różnych stron szereg sprzeciwów, opartych na nowych doświadczeniach w tym kierunku, wyniki których są sprzeczne z wynikami szkoły Willstaettera.

Stara więc i już zaczynająca przechodzić w zapomnienie kwestja charakteru białkowego enzymów, znów stała się aktualną. I znów stoimy przed dawnem zagadnieniem: czy enzymy są proteinami, czy też niemi nie są.

HISTORJA.

Jak już wspomniano dawni badacze wszyscy, niezależnie od tego jakie stosowali metody, otrzymywali rezultaty, świadczące, że amylaza jest substancją białkową.

Osborne i Campbell (13, 14) przez stosowanie wysalania — wytrącania enzymu siarczanem amonu, otrzymywali ze słodu substancję enzymatycznie bardzo czynną, zawierającą około 17% azotu. Uważali ją za mieszaninę albuminy (leukozyny) z peptonem lub proteozą.

Z tego samego mniej więcej okresu są badania A. Wróblewskiego (23). Autor stosował do oczyszczania enzymu (diastaza ze słodu) podwójną technikę. Najprzód wyciągał słabym alkoholem i z tego roztworu strącał enzym alkoholem o wyższej koncentracji. Osad rozpuszczony w wodzie był czynny, ale zawie-

rał białko i węglowodan, określony przez niego jako araban. Dla dalszego oczyszczenia tego preparatu stosował frakcjonowane wysalanie siarczanem amonu (24). Z trzech frakcyj otrzymanych w ten sposób, przez zastosowanie 50%-wego siarczanu amonu, 60%-wego i nasyconego, pierwsza zawierała tylko amylazę, druga amylazę i araban, trzecia tylko araban.

Pierwsza frakcja dawała wyraźną reakcję z odczynnikiem Millona, ksantoproteinową i biuretową, zawierała 16,5% azotu i wykazywała cechy chemiczne właściwe ciałom o charakterze albumin. Co do znaczenia arabanu autor sam wyraźnie się nie wypowiada za jego przynależnością do enzymu, przypuszcza, iż nie ma on żadnego znaczenia przy rozkładzie skrobi przez amylazę.

Dużo później do takich samych wyników, niezależnie od Wróblewskiego, nie wiedząc nawet o jego doświadczeniach, doszedł Biedermann (1). Pracował on nad amylazą ślinową — ptyaliną. Otrzymywał ją przez strącanie alkoholem i rozpuszczanie otrzymanego osadu w 0,5% chlorku sodu. Przez zastosowanie kilkakrotnego strącania i rozpuszczania w powyższy sposób, doszedł do substancji, która w swoich własnościach chemicznych wykazywała cechy charakterystyczne dla albumoz.

Wnioskuje stąd, że amylaza ślinowa stoi w ścisłym związku z albumozą występującą obok mucyny i białek właściwych w ślinie. Nazwał on ją „Speichelalbumose". Stanowi ona substancję, wykazującą cechy wspólne białkom właściwym i albumozom. Stwierdził, że siła diastyczna śliny jest wprost proporcjonalna do ilości tej substancji w niej zawartej, a strącalnej przez alkohol i rozpuszczalnej w chlorku sodu.

Podobną substancję autor znalazł również w słodzie. Otrzymanie jej jednak ze słodu, przedstawia znacznie większe trudności, ze względu na daleko bogatszy skład jakościowy słodu w porównaniu ze śliną. Przy otrzymywaniu tej substancji ze słodu zapomocą strącania alkoholem, strąca się jednocześnie bardzo wiele innych ciał o charakterze gum, węglowodanów i t. p.

Na tej podstawie autor wnioskuje, że wszędzie gdzie występuje funkcja diastatyczna, jest ona związana z ciałami o charakterze albumoz i wobec tego należy uważać te ostatnie za organiczny składnik kompleksu „amylaza". Podobnie zresztą do Wróblewskiego znalazł w preparatach z wyciągu słodowego i „maltyny" Mercka węglowodan, który jednak uważa, tak samo jak Wróblewski, za domieszkę tylko, pozbawioną znaczenia dla funkcji diastatycznej.

Zbliżone stanowisko zajmuje Sherman (17—22) i jego szkoła. Opowiadają się oni wprost za poglądami Osborne'a. W szeregu licznych doświadczeń, trwających od r. 1911 do chwili obecnej, głównie nad amylazą trzustkową, a częściowo i nad ślinową i słodową, stale stoją na stanowisku, że enzym ten jest substancją białkową. W ciągu tego długiego okresu czasu niejednokrotnie zmieniali metodę oczyszczania enzymu, dochodząc do preparatów o wysokim stopniu jednolitości chemicznej i czynności enzymatycznej, nigdy jednak nie udało im się otrzymać substancji czynnej enzymatycznie a pozbawionej charakteru proteinowego. Zasadnicza metoda (17) przez nich stosowana, polegała na wyciąganiu diastazy 50%-wym alkoholem etylowym i wytrącaniu z tego roztworu enzymu mieszaniną alkoholu i eteru. Zakładali więc, że kompleks białkowo-enzymatyczny ma charakter protein, rozpuszczalnych w 50%-wym alkoholu etylowym. Osad otrzymany tą drogą podlegał rozpuszczeniu w małej ilości wody i ponownemu strąceniu pięciokrotną ilością alkoholu absolutnego. Otrzymany osad rozpuszczali wreszcie w 50%-wym alkoholu i poddawali dializie. Podczas dializy ilość białka wydatnie się zmniejszała. Po dializie ponownie strącali enzym mieszaniną alkoholu i eteru. Proces ten powtarzali kilkakrotnie, modyfikując w różny sposób koncentrację alkoholu i czas dializy. W każdym jednak wypadku produkt otrzymany, o znacznie zwiększonej w porównaniu z wyjściowym sile enzymatycznej, wykazywał charakter białek. Analiza elementarna dała w jednym z wypadków następujące cyfry:

C%	H%	N%	O
52,8	6.7	15,5	25,0

Analiza powyższa wskazuje na charakter proteinowy tych substancyj. W jednej z następnych prac (18) nad amylazą trzustkową, autorzy dokonali dokładniejszej analizy otrzymanego preparatu.

Wynik otrzymali następujący:

w %-ach	C	H	N	S	P	O i reszta
	51,9	6,6	15,3	1,0	0,8	24,4

Z analizy wynika wielkie podobieństwo tego ciała do kazeiny i albuminy.

Przy ogrzewaniu w 70° C. produkt rozpuszczony w wodzie daje koagulat, przesącz zawiera proteiny i peptony. Autorzy wnio-

skują stąd, że enzym tworzy się z jakiegoś białka preformowanego (preexistent) przez procesy hydrolizy, związane być może z jakiemiś procesami utleniającemi.

W roku 1915 zostały przez Shermana opublikowane 2 prace nad amylazą słodową (19, 20). Wyniki jej są zgodne z wynikami dla amylazy trzustkowej. Preparaty otrzymane, o dużym stopniu czystości i aktywności enzymatycznej, stale zawierały około 15% azotu i zachowywały się, podobnie jak poprzednie, jak albuminy.

Z porównania preparatów amylazy trzustkowej i słodowej wynika, że obie one stanowią substancje zbliżone, ale różniące się pod niektóremi względami. Obie są to bezpostaciowe substancje azotowe, rozpuszczalne w wodzie i 50%-wym alkoholu, a nierozpuszczalne w alkoholu stężonym i acetonie. Obie wykazują reakcje ksantoproteinową, biuretową, Millona i ninhydrynową, Obie zawierają 15—16% azotu i przy analizie v. Slyke'a dają ośm charakterystycznych form związków azotowych, w stosunku takim, w jakim substancje te występują w kazeinie, edestynie lub hemoglobinie. Obie przy ogrzewaniu dają koagulat albuminowy i proteozę względnie pepton. Różnica polega na różnem optimum pH i na różnej sile diastatycznej. Zasadniczo amylaza trzustkowa jest znacznie aktywniejsza niż słodowa. Pozatem preparaty amylazy trzustkowej mają zdolność hydrolizowania obok skrobi także białek: kazeiny i żelatyny, zdolności tej preparaty amalyzy słodowej nie wykazują.

W ostatnich latach, już po całym szeregu prac szkoły Willstaettera, wyniki których całkowicie przeczyły hypotezie o charakterze białkowym enzymu diastatycznego, Sherman (21) wespół z swoimi współpracownikami zastosował również adsorbcję jako metodę oczyszczania tych substancyj.

Po wstępnych próbach zastosowali metodę następującą: adsorbcja odbywały się przy pH 5,2—6,0 w obecności 25% alkoholu i przy zastosowaniu 0,6—0,8 gr Al_2O_3 na każde 100 ccm wyciągu enzymatycznego. Do readsorbcji stosowali rozcieńczony ług sodowy. Z readsorbatu wytrącali enzym mieszaniną eteru i alkoholu. Preparat otrzymany wykazywał siłę enzymatyczną wyrażoną liczbą 3760 (wyjściowa pankreatyna — 512). Tak dużego stopnia oczyszczenia bez stosowania adsorbcji nie otrzymywali nigdy.

Charakter chemiczny uzyskanego preparatu nie różnił się jednak od poprzednich. Wykazywał on taką samą zawartość azotu i tak samo jak poprzednie, wykazywał własności chemiczne właściwe albuminom.

Zastosowanie powtórnej adsorbcji nie zmieniło w niczem własności chemicznych otrzymanego ciała.

Również ostatnia praca tego autora (22) nad amylazą słodową przeczy wynikom szkoły Willstaettera.

Stosując nową metodę, opartą na frakcjonowanem wysalaniu enzymu siarczanem amonu, rozpuszczaniu otrzymanego osadu w wodzie i ponownem, frakcjonowanem wytrącaniu alkoholem etylowym o różnej koncentracji, — otrzymali preparaty amylazy słodowej o bardzo wysokim stopniu aktywności enzymatycznej.

Otrzymany produkt zawierał 16% azotu, wykazywał wszystkie reakcje charakterystyczne dla białek i tak samo jak te ostatnie, ulegał strącaniu i denaturacji połączonym z jednoczesną utratą funkcji enzymatycznej.

Również Luers i Sellner (9, 10, 11) pracowali nad amylazą słodową, stosując technikę oczyszczania enzymu przez adsorbcję, ściśle według Willstaettera. Po zastosowaniu dwukrotnej adsorbcji i następnej eluacji otrzymali produkt o 25—30-krotnie zwiększonej sile enzymatycznej. Dalsza adsorbcja nie zmieniała już stopnia czystości enzymu. Otrzymany preparat wykazywał następującą zawartość białka i węglowodanów:

	Białka	Węglowodany
Materjał wyjściowy w %-ach	42,99	74,4
„ otrzymany „	43,56	28,07

Proces oczyszczania przez adsorbcję według Willstaettera prowadzi więc do usunięcia węglowodanów, a nie białek.

Analiza metodą v. Slyke'a dała ten sam rezultat co u Shermana. Pomimo więc siedmiokrotnie większego stopnia oczyszczenia niż u Shermana, skład chemiczny pozostał ten sam. Autorzy jednak nie wnioskują stąd, iż białko jest istotnym składnikiem enzymu, przypuszczają natomiast, iż usunięcie białek jest tylko kwestją zastosowania jeszcze bardziej celowej metody, niż nią jest metoda adsorbcyjna Willstaettera.

Zupełnie odmienne dane co do charakteru chemicznego amylazy wynikają z doświadczeń szkoły Willstaettera. Pracowali oni głównie nad amylazą trzustkową, mniej nad słodową. Przez wykorzystanie różnej zdolności adsorbcyjnej trzech enzymów zawartych w soku trzustkowym (lipazy, trypsyny i amylazy), udało im się oddzielić te enzymy od siebie i poddać je potem dalszemu procesowi oczyszczania.

Willstaetter, Waldschmidt-Leitz i Hesse (26, 27, 28) adsorbowali lipazę z kwaśnego roztworu na wodorotlenku glinu, z pozostałości adsorbowali trypsynę na kaolinie w roztworze również kwaśnym. Pozostawała w ten sposób amylaza wolna od lipazy i trypsyny. Już jednak ten przedwstępny proces związany jest ze znacznemi stratami w samej ilości amylazy, gdyż za każdym razem ulegała i ona wprawdzie nieswoistej, ale jednak częściowej adsorbcji.

W tym stanie amylaza adsorbuje się już bardzo trudno, i to tylko z roztworu zawierającego 50% alkoholu. W rezultacie autorzy otrzymali preparaty amylazy 130 razy silniejsze niż gruczoł wyjściowy, 70 razy silniejsze niż otrzymane przez Eulera i Svanberg'a (3) i 10 razy silniejsze niż najczystsze preparaty Shermana. Preparaty te nie dawały żadnej z reakcyj charakterystycznych dla białek ani węglowodanów, z wyjątkiem słabej reakcji dodatniej z odczynnikiem Molischa. Autorzy stoją wobec tego na stanowisku, że amylaza, tak samo zresztą jak inne enzymy, nie jest substancją białkową. Białko stanowi jedynie substancję towarzyszącą enzymowi (Nebenprodukt), taksamo jak są niemi liczne inne substancje o innym charakterze, jak np. węglowodany. Różnica polegałaby jedynie na tem, że enzym jest bez porównania silniej związany z białkiem, aniżeli z innemi substancjami towarzyszącemi.

Enzym według Willstaettera (29) składa się z koloidalnego podłoża (Träger) i z właściwej enzymatycznie czynnej grupy. Usunięcie podłoża koloidalnego nie powinno wpłynąć na czynność samego enzymu. O charakterze chemicznym koloidalnego podłoża autor nic bliższego nie podaje.

Również Fricke i Kaja (7, 8) otrzymywali z „Diastase absolut" Merck'a, przez zastosowanie elektroosmozy i elektrodializy, preparaty niewykazujące żadnej reakcji białkowej. Preparaty te były bardzo ubogie w popiół (mniej niż 0,05%), zawierały mało azotu (około 4%), natomiast bogate były w węglowodany — dawały wyraźną reakcję z odczynnikiem Molischa.

Chcąc lepiej zrozumieć tę rozbieżność w wynikach poszczególnych autorów, należy uwzględnić kilka czynników wpływających na to. Przedewszystkiem operowali oni niejednakowym materjałem doświadczalnym. Skład chemiczny otrzymanych przez nich preparatów w dużym stopniu był zależny od materjału wyjściowego, od jego mniej lub więcej skomplikowanego składu. Tak nprz. w pracach nad amylazą trzustkową, względnie ślinową,łatwiej

jest osiągnąć stosunkowo czyste substancje, niż przy operowaniu tak bardzo złożonem chemicznie ciałem, jakiem jest nprz. wyciąg z ziarn jęczmienia. Drugi czynnik to stosowanie niejednakowych kryterjów dla rozstrzygnięcia sprawy charakteru chemicznego otrzymanego ciała. Jedni chorzy, jak Sherman i inni, stosowali całkowitą analizę elementarną i na podstawie stosunku ilościowego poszczególnych pierwiastków, wchodzących w skład badanego preparatu enzymatycznego, wnioskowali o jego przynależności, lub nieprzynależności do substancyj białkowych.

Inni poprzestawali na stosowaniu zazwyczaj używanych prób jakościowych do wykrycia białka, a więc używali w tym celu odczynnika Millona, kwasu pikrynowego, kwasu azotowego i t. p.

Pierwszy z wymienionych sposobów, mianowicie analiza elementarna, daje wyniki daleko pewniejsze niż drugi.

Jeśli bowiem chodzi o stosowanie odcz. Millona, Essbacha (kwas pikrynowy) i t. p., to wyniki otrzymane z ich pomocą są zależne przedewszystkiem od ilości materjału wziętego do próby, a pozatem od tego, z jaką grupą białek mamy do czynienia.

Niestety rzadko autorzy podają z jakiemi ilościami wagowemi otrzymanych preparatów pracowali. Wynik ujemny reakcji białkowej zależy nietylko od braku tej substancji, ale również od tego, czy ilość jej nie leżała poniżej granicy wykrywalności przez dany odczynnik.

Z drugiej strony brak reakcji dodatniej z danym odczynnikiem, może być spowodowany brakiem w badanej substancji pewnego określonego składnika, reagującego na stosowany odczynnik. Tak nprz. odczynnik Millona reaguje jedynie z tyrozyną występującą w drobinie białkowej, — białko pozbawione tyrozyny da z odczynnikiem Millona reakcję ujemną, stąd prosty, ale niesłuszny wniosek, że substancja badana nie posiada charakteru białkowego.

Dla zilustrowania tego podajemy, wykonane z albuminą jaja kurzego, próby na czułość zazwyczaj stosowanych odczynników, służących do wykrycia substancyj białkowych.

białko mg w 1 cm³	odczyn. Millona	odczyn. Essbacha	kwas azotowy
10	+++	+++	+++
1	++	++	+
0,1	+	+	+
0,05	±	±	—
0,02	—	—	—
0,01	—	—	—

Widać stąd, że już przy ilości wynoszącej 0,1 mg albuminy w 1 ccm reakcja ksantoproteinowa nie daje pewnego wyniku, wynik pewny daje natomiast odczynnik Millona i kwas pikrynowy. Mniejszych od powyższej ilości już żadnym odczynnikiem wykryć nie można — reakcja ksantoproteinowa wypada ujemnie, odczynnik Millona i kwas pikrynowy dają wyniki wątpliwe.

Jeśli uwzględnimy ten czynnik, to wnioski autorów co do charakteru proteinowego, względnie nieproteinowego badanego enzymu, na podstawie jedynie prób z wymienionemi odczynnikami, bez podania ilości substancji badanej wziętej do próby, nie mogą być uważane za całkowicie pewne.

Pewne natomiast są wnioski oparte na analizie elementarnej otrzymanego preparatu enzymatycznego; w takim wypadku stosunek pierwiastków rzuca jasne światło na jego charakter chemiczny.

Z drugiej strony spotkać się można z poglądem, że amylaza nietylko nie jest białkiem, ale nie jest nawet substancją koloidalną.

I tak Fraenkel i Hamburg (6) przez zastosowanie kombinowanego oczyszczania składającego się z:

1) oczyszczania chemicznego, polegającego na strącaniu rozcieńczonym octanem ołowiu,

2) mechanicznego, przez sączenie przez filtry Pukalla,

3) biologicznego, polegającego na fermentacji węglowodanów zapomocą rasy drożdży Frohberg,

otrzymywali enzym w postaci proszku całkowicie pozbawionego węglowodanów i niewykazującego żadnej reakcji na białko. Preparat otrzymany prawie nie wykazywał cech koloidu i tak nprz., nie podlegał adsorbcji przez koloidy nieorganiczne, niezależnie od tego jaki był ładunek elektryczny użytego adsorbentu i odczyn środowiska w jakim się adsorbcja odbywała, pozatem przechodził przez ultrafiltry, nie wykazywał zjawiska kataforezy nawet pod wpływem silnego prądu elektrycznego i t. p. Jedynie zachowanie się jego pod ultramikroskopem dowodziło, że jest on koloidem o bardzo małej wielkości cząstek. Praca powyższych autorów była kontynuowana przez E. Pribrama (16). Stosował on metodę podobną do poprzedniej, przyczem główny nacisk kładł na stronę biologiczną procesu oczyszczania. Enzym oczyszczony drogą biologiczną ulegał jeszcze potem dializie lub sączeniu przez ultrafiltry. Substancja enzymatycznie czynna otrzymana przez autora, okazała się jednak ciałem koloidalnem, o bardzo wysokim stopniu roz-

proszenia. Składa się ona z dwóch głównych składników: pierwszy stanowi ciało o charakterze polipeptydu, składającego się z niewielu aminokwasów i zawierającego 6—8% azotu. Drugie jest to substancja węglowodanowa, stanowiąca prawdopodobnie spolimeryzowany kwas węglowodanowy.

WŁASNE BADANIA.

W pracy niniejszej starano się przez zastosowanie metod własnych i dotychczas przez innych badaczy stosowanych, stwierdzić, czy możliwem jest oddzielić funkcję enzymatyczną badanego materjału od jego struktury białkowej.

Dla oczyszczenia enzymu stosowano następujące metody:

1) dializę,
2) frakcjonowane wyciąganie enzymu ze słodu,
3) frakcjonowane strącanie białek przy różnem pH,
4) adsorbcję.

1. DIALIZA.

Materjał wyjściowy stanowił słód jęczmienny browaru Haberbusch i Schiele. Słód zmielony zalewano wodą destylowaną w stosunku 3 gr. wody na 1 gr. słodu, skłócano dokładnie z 1% toluenu i zostawiano, często skłócając, na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie wyciskano przez płótno i mętny wyciąg sączono przez bibułę, aż do otrzymania klarowanego płynu. Wyciąg taki zawierał zawsze znaczne ilości białek i węglowodanów.

Wyciąg w ten sposób otrzymany poddawano dializie w woreczkach kolodjowych wobec wody destylowanej. Sposób przeprowadzania dializy został opisany w poprzedniej pracy (4).

Podczas dializy wytrącał się zawsze po krótszym lub dłuższym czasie — zwykle wtedy, gdy zawartość składników mineralnych w płynie dializowanym znacznie spadała, brunatny, lepki osad. Bliższe badanie wykazało, że osad ten w głównej mierze stanowi białko. Jest on nierozpuszczalny w wodzie, rozpuszcza się natomiast prawie całkowicie w kwasie solnym i w norm. chlorku sodu. Roztwór jego w chlorku sodu wykazuje wszystkie reakcje charakterystyczne dla białek a więc: ksantoproteinową, Millona,

strąca się przez kwas pikrynowy. W pierwszem przybliżeniu można go uważać za globuliny ziarna jęczmiennego.

Co do samej dializy, to dało się stwierdzić, iż nawet najdłużej prowadzona dializa nie daje w rezultacie płynu całkowicie pozbawionego składników mineralnych i białek, choć ilość ich znacznie spada. Wyciągi dializowane wykazują zawsze dość znaczną zawartość substancyj białkowych, nawet wyciągi bardzo słabo enzymatycznie czynne zawsze białko zawierają. Z drugiej strony w każdym wypadku, gdy zaobserwowano przechodzenie przez woreczek dializacyjny białka, szło z tem równolegle przechodzenie enzymu. Ogólnie można powiedzieć, że przez cały czas trwania dializy wyraźnie występowało istnienie jakiegoś bardzo ścisłego związku między enzymem a tą frakcją białka wyciągu wodnego, która przy dializie nie ulegała wytrąceniu, a więc była rozpuszczalna w wodzie pozbawionej prawie całkowiecie elektrolitów.

Z szeregu doświadczeń przeprowadzonych w tym kierunku przytoczyć można następujące:

Wyciąg ze słodu, przygotowany w sposób wyżej podany, poddano dializie.

Wykazywał on obecność białka, ilość którego nie została określona.

Zawartość suchej substancji wynosiła — 8%.

Składników mineralnych — 4,1% suchej masy.

pH wyciągu było równe 5,9.

300 ccm tego wyciągu poddano dializie wobec wody destylowanej ze szkła. Ogólna ilość wody zużytej do dializy stanowiła 14 l. Dializat wykazywał, zgodnie z tem co podano wyżej, osad brunatny wytrąconego białka. Po odsączeniu go od wytrąconego osadu białkowego, otrzymano płyn lekko opalizujący, barwy białożółtej. Wykazywał on wyraźną zawartość białka. Bardzo znacznie spadła ilość suchej substancji, wynosiła teraz tylko — 0,06%. Podczas dializy zostało więc usunięte 99,2% suchej masy wyciągu słodowego. Cyfra ta jest trochę wyższa niż otrzymana w analogiczny sposób przez Eulera i Svanberga (3) (98,4%). Zawartość składników mineralnych zmniejszyła się również bardzo znacznie, nie w takim jednak stopniu jak sucha substancja. Ogólna ilość popiołu wynosiła teraz 22 razy mniej niż przed dializą, w odniesieniu jednak do suchej masy wypadało go znacznie więcej, bo 26,6% zamiast — 4,1% było go więc 6-cio krotnie więcej. Zmniejszyła się również znacznie, około 30-krotnie, zawartość substancyj redukujących.

Z wyciągiem dializowanym przesączonym i z osadem białkowym wytrąconym podczas dializy, rozpuszczonym w norm. roztworze chlorku sodu, wykonano doświadczenie nad zdolnością hydrolizowania przez te dwa płyny skrobi.

Doświadczenie odbywało się w temp. pokojowej ($18^0 \pm 1^0$ C) i trwało 72 godziny. Ilość płynu reagującego była wszędzie ta sama, mianowicie 52,5 ccm, z czego 50 ccm stanowiła 2%-wa skrobia rozpuszczalna Kahlbauma, a 2,5 ccm wyciąg dializowany, względnie odpowiednia ilość osadu rozpuszczonego w chlorku sodu. Przytem osadu rozpuszczonego w chlorku sodu wzięto w jednym wypadku tyle ile wyciągu dializowanego, w drugim zaś podwójną ilość tego. pH płynów badanych wahało się od 3,9 do 4,1. Aby wyeliminować wpływ samego chlorku sodu, dodano do jednej próby tylko odpowiedną ilość tej soli bez żadnego czynnika enzymatycznego, i do jednej próby, zawierającej wyciąg dializowany, odpowiednią ilość chlorku sodu.

Rozkład badano jakościowo metodą Wohlgemutha, równolegle zaś metodą Bertranda oznaczano ilość cukrów redukujących Wyniki ilustruje tablica I.

TABLICA I.

Nr. kolby	przes. w ccm	osad w ccm	n/1 NaCl w ccm	H_2O w ccm	barwa z J po 72 g.	Cu w mg po 48 g.
1	1,25			1,25	czerw.	14,5
2	1,25		1,25		czerw-fiol.	13,3
3(kontr.)			1,25	1,25	granat.	0,8
4		1,25		1,25	„	1,3
5	2,50				żółta	15,6
6		2,50			granat.	1,3

Z doświadczenia wynika, że osad białkowy, wytrącony z wyciągu podczas dializy, nie posiada żadnej zdolności hydrolitycznej w stosunku do skrobi, ani próba z jodem, ani oznaczanie cukrów redukujących nie dało żadnego rezultatu.

To samo doświadczenie, powtórzone z podwójnemi w stosunku do poprzednich ilościami wyciągu dializowanego i osadu, dało wyniki identyczne.

A więc białko wytrącające się podczas dializy, nierozpuszczalne więc w wodzie zawierającej mało elektrolitów, nie ma zdolności enzymatycznych. Można więc założyć, że nie stoi ono

w żadnym związku z czynnikiem enzymatycznym, nie stanowi jego części składowej, nie stanowi też podłoża, na którem enzym się adsorbuje.

W dalszej serji doświadczeń starano się w silniejszym jeszcze stopniu oddzielić białko od enzymu, zawartego w wyciągu słodowym dializowanym.

Użyto do doświadczenia 550 ccm wyciągu sporządzonego w sposób jak podano poprzednio.

Zawierał:	suchej masy	8%
	popiołu w stosunku do suchej masy	3,8%
	azotu „ „ „ „	2,34%
w tem	„ białkowego	0,75%
	„ niebiałkowego	1,56%

stosunnek więc azotu białkowego do niebiałkowego był: 1 : 2. Wyciąg ten poddano dializie w sposób poprzednio podany. W rezultacie otrzymano, jak zwykle, płyn opalizujący, biało-żółtawy z dość obfitym, brunatnym, ciągliwym osadem. Po oddzieleniu osadu płyn odwirowany zawierał suchej masy 0,04%.

Próby jakościowe na białko, a więc: strącanie kwasem pikrynowym, odczynnikiem Millona i ksantoproteinowa wypadły dodatnio, ale znacznie słabiej niż w wyciągu surowym.

Analiza azotowa wykazała w procentach suchej masy:

azot białkowy	6,3%
„ niebiałkowy	1,06%

stosunek azotu białkowego do niebiałkowego zmienił się więc z 1 : 2 na 6 : 1.

W wyciągu surowym na każdy gram suchej masy przypadało 23 mg azotu, w wyciągu dializowanym przypadało go na 1 gr suchej masy 73 mg.

Wobec tego, że próby dokonane z wyciągiem surowym wykazały, że można bez uszkodzenia a nawet osłabienia enzymu strącać z niego białko octanem ołowiu, spróbowano zastosować tę metodę dla usunięcia resztek białka z wyciągu przedializowanego. W tym celu wyciąg dializowany skoncentrowano 8-krotnie przy 40° C w próżni i zadano go kilkoma kroplami 1%-owego octanu ołowiu. Powstały osad białka oddzielono na sączku, przesącz zaś, dla uwolnienia go od resztek octanu ołowiu, poddano dializie. Po dwu-

dniowej dializie płyn nie wykazywał już obecności ołowiu. Zbadany na zawartość białka zwykle stosowanemi odczynnikami, a więc kwasem pikrynowym, odczynnikiem Millona i kwasem azotowym, wykazał całkowitą nieobecność tych ciał. Doświadczenie nad jego zdolnością hydrolityczną wobec skrobi dało jednak również wynik ujemny. Wyniku tego nie można położyć na karb braku elektrolitów, gdyż również dodanie do badanego płynu popiołu z wyciągu surowego, co zwykle wpływa korzystnie na wyciąg dializowany, w niczem nie zmieniło jego zdolności, a raczej braku zdolności hydrolitycznej wobec skrobi. Zjawisko to należy tłumaczyć tem, że octan ołowiu strącił całą resztę białka, a z nim i enzym zawarty w wyciągu.

Przez cały czas trwania tego doświadczenia można było znów zaobserwować równoległość między zawartością białka w płynie badanym, a jego aktywnością enzymatyczną. Najsilniejszy jest wyciąg surowy, zawierający białka najwięcej, słabszy już dializowany, zawierający go mniej niż surowy, wyciąg zaś, otrzymany po całkowitem usunięciu białka (octanem ołowiu), jest już zupełnie enzymatycznie nieczynny.

2. FRAKCJONOWANE WYCIĄGANIE ENZYMU.

Do takich samych wniosków doprowadziło stosowanie frakcjowanego wyciągania enzymu ze słodu.

Zastosowano następujące płyny do ekstrakcji:

a) alkohol 96%-owy,
b) woda destylowana,
c) ług potasowy 0,2%-owy,
d) chlorek sodu 10%-owy.

200 gr słodu zalano 600 ccm alkoholu 96%-owego, mocno skłócono i zostawiono w temp. pokojowej na 5 godzin. Po tym czasie wyciąg alkoholowy odsączono i pozostałość słodu, po odparowaniu na powietrzu resztek alkoholu, zalano 600 ccm wody destylowanej. Po upływie 5-ciu godzin znów odsączono wyciąg wodny i pozostały słód traktowano kolejno w ten sam sposób ługiem potasowym 0,2%-wym i chlorkiem sodu 10%-wym, otrzymując wyciągi w tych płynach.

Otrzymane 4 wyciągi wykazywały następujące własności:

	stos. s. masy	azot w % s. masy	zawart. enzymu	zawart. białka
wyciąg wodny . .	1,0	2,7	+	++
„ alkoholowy	3,9	0,9	—	+
„ w KOH . .	2,3		—	+
„ w NaCl . .	1,0	0,57	—	+
słód suchy . . .	—	1,52		

Wynika stąd, że enzym jest zawarty tylko we frakcji wodnej, a więc jest związany z białkami rozpuszczalnemi w wodzie. Wyciągi w alkoholu, w chlorku sodu i w ługu potasowym również białko zawierają, a jednak nie wykazują żadnego działania hydrolitycznego w stosunku do skrobi.

3. FRAKCJONOWANE STRĄCANIE BIAŁEK PRZY RÓŻNEM pH.

Z serji pierwszej i drugiej doświadczeń wynikało, że to białko z którem enzym jest w sposób bliżej niezbadany, czy to przez siły powierzchniowe, czy w sposób chemiczny, — związany, należy do białek rozpuszczalnych łatwo w czystej wodzie, niezawierającej elektrolitów. W pierwszem przybliżeniu możnaby więc powiedzieć, że jest on związany z albuminami.

W tej serji doświadczeń starano się w inny jakiś sposób rozdzielić białka, występujące w wyciągu ze słodu na frakcje różniące się między sobą. Zastosowano strącanie białek zapomocą kwasu octowego przy różnem stężeniu jonów wodorowych, które osiągano przez stosowanie kwasu o różnej koncentracji. Jak wiadomo, białko strąca się z roztworu w swoim punkcie izoelektrycznym. Spodziewano się więc, że przez zastosowanie różnych pH uda się wywołać strącenie różnych frakcyj białek, zależnie od tego dla której z nich stosowane pH stanowi jej punkt izoelektryczny. W dalszym ciągu zaś łatwo już można skonstatować, z którą z tych frakcyj jest związany enzym.

M e t o d y k a. 10 ccm wyciągu ze słodu nalewano do kolbki miarowej, pojemności 50 ccm, dolewano odpowiednią ilość kwasu octowego, dopełniano wodą destylowaną do 50 ccm i strącano białko w łaźni wodnej przy 40° C w ciągu 10 min. Po ostudzeniu oznaczano pH płynu i zostawiano go w temp. 5°—10° C na 24 godz. Po

tym czasie oddzielano płyn od osadu zapomocą wirówki i zbierano oddzielnie płyn i osad.

Osady zebrane przemyto kilkakrotnie wodą podwójnie destylowaną ze szkła i sprawdzono zdolność hydrolityczną w stosunku do skrobi poszczególnych osadów i wód użytych do ich przemycia.

Sprawdzono również zapomocą kwasu pikrynowego, które płyny z przemycia osadów zawierają białko.

Okazało się, że wszędzie tam, gdzie osad wywoływał rozkład skrobi, wywoływała go również woda, użyta do przemywania tych osadów i w każdym wypadku woda ta zawierała białko. Przytem było to znów białko rozpuszczalne w wodzie, a więc o charakterze albumin.

We wszystkich wypadkach zaś, gdzie osad nie rozkładał skrobi, nie rozkładała jej również woda użyta do przemywania i w każdym takim wypadku nie zawierała ona białka.

Ilustruje to poniższa tablica II.

TABLICA II.

Nr. próby	strąc. przy pH	zawart. enz. w osadzie	zawart. enz. w wodzie	zawart. biał. w wodzie
0	6,00	—	—	—
1	5,74	+++	+	+
2	5,59	+++	+	+
3	5,34	+++	+	+
4	5,18	+++	+	+—
5	5,00	+++	+	+
6	4,88	++	+	+
8	4,74		+	+
9	4,64	+++	+	+
11	4,48	++	+	+—
12	4,32	++	+	+
14	4,38	++	+	+
15	4,04	++	+	+
16	3,88	+	+	+
17	3,86	+—	+	+
18	3,78		—	
19	3,66	+—	—	
21	3,52	—	—	—
22	3,38	—	—	—
23	3,28		—	—
25	3,10	—	—	—
26	3,00	—	—	—
27	2,90	—	—	—
28	2,76	—	—	—

Dwa z otrzymanych przez strącenie kwasem octowym osady poddano bliższej analizie.

Osad Nr. 6 otrzymany przez strącenie białka przy pH — 4,88, stanowi jeden z tych osadów, które zawierały enzym, a więc rozkładały skrobię jak również woda użyta do jego przemycia zawierała enzym i białko.

Osad Nr. 25, otrzymany przez strącenie białka przy pH — 3,10, nie zawiera enzymu, nie rozkłada więc skrobi — to samo stosuje się do wody użytej do jego przemycia. Woda ta również nie zawiera białka.

Oba badane osady rozdzielono na frakcje:

1. rozpuszczalną w wodzie (destylowanej ze szkła),
2. rozpuszczalną w 10%-owym chlorku sodu,
3. rozpuszczalną w 70%-owym alkoholu etylowym,
4. rozpuszczalną w 0,1%-owym ługu potasowym.

Każdą z otrzymanych frakcyj zbadano jakościowo na zawartość białka i na zdolność hydrolizowania przez nią skrobi. Wyniki są podane w następujących tablicach.

Osad Nr. 6.

TABLICA III.

	w mg	w %-ach	zawart. białka	rozkł. skrobi
osad całkowity	1,9	100		+
frakcja rozp. w H_2O	0,3	15,8	+	+
„ „ w NaCl	0,7	36,8	+	?
„ „ w alk.	0,1	5,3	—	—
„ „ w KOH	0,7	36,8	+ +	—
reszta	0,1	5,3		

Osad Nr. 25.

TABLICA IV.

	w mg	w %-ach	zawart. białka	rozkł. skrobi
osad całkowity	2,3	100		—
frakcja rozp. w H_2O	0,0	0	—	—
„ „ w NaCl	0,7	30,4	+	—
„ „ w alk.	0,3	13,0	—	—
„ „ w KOH	1,1	47,8	+ +	—
reszta	0,2	8,7		

Powyższe tablice wyraźnie wykazują, że czynnik enzymatycznie czynny jest związany z frakcją białek rozpuszczalnych w wodzie. Zdolności hydrolitycznej w stosunku do skrobi nie wykazuje ani frakcja rozpuszczalna w NaCl, ani rozpuszczalna w KOH, choć obie one zawierają substancje białkowe i to w ilości dwukrotnie większej niż frakcja wodna.

Osad Nr. 25 nie rozkłada skrobi, nie zawiera on też frakcji białek rozpuszczalnych w wodzie — znów więc potwierdza się, że tylko ta frakcja białek jest nosicielem funkcji enzymatycznej.

Te same analizy wykazują jednak, że przypuszczenie, iż drogą strącania przy różnem pH uda się oddzielić od siebie poszczególne frakcje białka, było mylne. Oba badane osady zawierają mieszaninę białek — osad Nr. 6 — mieszaninę trzech frakcyj, osad zaś Nr. 25 — dwie frakcje. Należy jednak mieć na uwadze, że strącanie się białka w jego punkcie izoelektrycznym powoduje porwanie ze sobą również i białka innego, którego punkt izoelektryczny nie został jeszcze osiągnięty. Przytem proces ten nie daje się ściśle określić; ilość porwanego białka zależy od bardzo wielu czynników; jak od stosunku ilościowego białka strącającego się do porywanych, od ich stopnia dyspersji i t. p. Stosunkowe ilości poszczególnych frakcyj białek w obydwóch osadach są też równego rzędu. Zastanawiający jest brak w osadzie Nr. 25 frakcji rozpuszczalnej w wodzie. Należy założyć, iż bądź pH — 3,10 nie stanowi jej punktu izoelektrycznego, bądź nie uległa ona zupełnie „porwaniu" wraz z białkiem strącającym się, bądź też wreszcie uległa daleko posuniętym zmianom pod wpływem dodanego kwasu octowego. To ostatnie przypuszczenie jest najbardziej prawdopodobne, tembardziej, że jak to widać z tablicy V, płyn odwirowany Nr. 25 również skrobi nie rozkłada.

Zbadano również wszystkie płyny, otrzymane po odwirowaniu osadów. Oznaczono w nich azot białkowy (strącano białko wolframianem sodu z kwasem siarkowym) i określono ich zdolność hydrolizowania skrobi jakościowo (metodą Wohlgemutha) i ilościowo przez oznaczanie cukrów redukujących metodą Bertranda.

Mieszaniny reagujące zawierały wszystkie po: 50 ccm 2%-owej skrobi rozpuszczalnej Kahlbauma, 2 ccm płynu reagującego i odpowiednią ilość wody dest. dla zrównania koncentracji. pH mieszanin wahało się od 4,56 do 4,66.

Doświadczenie przebiegało w temp. 18°—20° C, czas trwania — 24 godz.

Próby brano co 2 godziny, ostatnią zaś po 24 godz. Wyniki ilustruje tablica V.

TABLICA V.

Nr. próby	pH pocz. mieszan.	pH końc. mieszan.	rozkł. po 24 g. Jod.	rozkł. po 23 g. mgCu	azot w %
0	4,56	4,58	jasno-żółta	12,0	7,33
1	4,65	4,72	„ „	12,6	
2	4,60	4,62	„ „	11,3	5,79
3	4,64	4,66	„ „	12,7	5,90
4	4,60	4,60	„ „	12,0	5,04
5	4,66	4,67	„ „	12,0	
6	4,64	4,66	„ „	12,6	
8	4,62	4,66	„ „	12,6	5,18
9	4,66	4,66	„ „	12,1	5,48
11	4,66	4,66	żółta	12,1	
12	4,66	4,67	jasno-żółta	12,7	
14	4,64	4,66	czerwona	11,8	5,60
15	4,64	4,68	fiol-czerw.	10,7	
16	4,62	4,66	„ „	10,3	5,48
17	4,62	4,63	fioletowa	9,8	
18	4,64	4,64	fiol-granat.	10,4	
19	4,64	4,62	„ „	9,9	4,56
21	4,59	4,60	gran-fiolet.	10,0	
22	4,62	4,62	„ „	9,6	
23	4,62	4,62	granatowa	9,7	5,79
25	4,58	4,54	„	1,5	4,84
26	4,56	4,54	„	0,5	
27	4,60	4,58	„	0,4	5,18
28	4,60	4,63	„	0,3	5,18

Następne doświadczenie tej serji zostało wykonane w sposób analogiczny do poprzedniego z tą różnicą, iż stosowano większe odstępy pH przy strącaniu białek.

Mianowicie strącano przy pH równem:

5.74, 4.88, 4.60, 4.36, 4.00, 3.54, 3.28.

Próby jakościowe na zawartość białka wykazały, że białko z wyciągu surowego rozdzieliło się między przesącz i osad. W żadnym wypadku nie nastąpiło strącenie całkowitej ilości białka z wyciągu, taksamo nie było żadnej próby, w którejby wcale nie nastąpiło strącenie osadu białkowego. Zjawisko to zostało już omó-

wione powyżej. Tutaj można jeszcze dodać, że staje się ono zupełnie jasnem, jeśli uwzględnimy, że wyciąg słodowy zawiera białko nie jednego, a kilku typów i dlatego też przy każdem pH stosowanem wytrąca się przedewszystkiem tylko ta frakcja białek, dla której stosowane pH stanowi jej punkt izoelektryczny, lub leży w jego pobliżu — punkt ten zaś jest różny dla różnych białek. Pozatem wchodzi tu jeszcze w grę tak zwana okkluzja t. j. porywanie mechaniczne przez białko strącone innych substancyj, a więc i białek koloidalnie, rozproszonych w płynie.

Z otrzymanych przesączów, po oddzieleniu osadów, niezmienioną siłę enzymatyczną w porównaniu z wyciągiem wyjściowym miały te tylko przesącze, z których białko uległo strąceniu przy Ph — 4,8 i 4,66.

Wszystkie pozostałe przesącze strącane przy pH niższem od 4,64 do pH — 3,28, wykazywały osłabienie swojej aktywności enzymatycznej. Możnaby stąd wnioskować, że te frakcje białek wyciągu słodowego, których punkt izoelektryczny leży w pobliżu pH = 4,6—4,8 nie są związane z enzymem.

Niestety niema dostatecznej ilości badań co do wartości punktów izoelektrycznych białek roślinnych. Z danych Pearsall'a i Ewing'a (15) wynika, że punkt izoelektryczny dla większości białek roślinnych przez nich badanych, leży przy pH = 4,3—4,5. Wymienieni autorzy nie podają jednak w swoich wynikach punktów izoelektrycznych dla białek jęczmienia. Dla gluteniny i gliadyny, a więc glutelin i prolamin występujących w ziarnie pszenicy, punkty te leżą przy pH = 4,4—4,5 dla gluteniny i 3,5—5,5 dla gliadyny. Możnaby z dużem prawdopodobieństwem przypuścić, że punkty izoelektryczne dla prolamin i glutelin jęczmienia zawarte są w tych samych granicach pH. Wynikałoby stąd, że w naszym wypadku przy pH = 4,6 — 4,8 zostały strącone z wyciągu słodowego prawie wszystkie białka w nim zawarte, prócz albumin.

Otrzymane wyniki znów więc potwierdzają poprzednie, mianowicie, że enzym diastatyczny jest powiązany jedynie z albuminami.

Jeśli założyć, że enzym stanowi substancję o charakterze niebiałkowym, jedynie zaadsorbowaną mechanicznie lub elektrycznie na białku, to byłoby bardzo trudno wytłómaczyć jego uporczywe towarzyszenie wyłącznie jednej, a mianowicie albuminowej, frakcji białek. Należałoby się spodziewać, że nietylko albumina ale i inne białka mogą go adsorbować.

Występowanie funkcji enzymatycznej jedynie w frakcji albuminowej, daje wszelkie pozory prawdopodobieństwa mniemaniu, że enzym sam jest substancją białkową, albuminową.

4. ADSORBCJA.

Na bibule. Wobec tego, że w literaturze spotyka się próby adsorbowania enzymów na bibule, (J. Effront (2)) zwłaszcza, że ewentualna adsorbcja enzymu na bibule ma duże znaczenie praktyczne, gdyż przy zabiegach preparacyjnych często sączymy przez bibułę, — zastosowano również w niniejszej pracy adsorbcję amylazy na bibule. Próby adsorbcji enzymu diastatycznego na bibule miały charakter jedynie jakościowych.

Używano bibułę zwykłą do filtrowania drobno sproszkowaną, lub częściowo shydrolizowaną. Okazało się, że enzym jak i białko adsorbuje się na takiej bibule jedynie w bardzo słabym stopniu, niezależnie od tego, czy stosowano bibułę sproszkowaną, czy też częściowo shydrolizowaną.

Najważniejsze jest jednak to, że enzym adsorbuje się w takim samym stopniu jak białko — w miarę ubywania białka ubywa również enzymu. Wyciągi, zawierającego mniej białka, są jednocześnie uboższe w enzym. Readsorbcja enzymu bez białka nie udaje się.

Przeprowadzono również próby adsorbowania enzymu na azbeście. Azbest adsorbuje w stopniu trochę silniejszym niż bibuła, ale podobnie jak na bibule enzym i białko ulegają na nim adsorbcji w równym stopniu.

Gdyby białko nie stanowiło składowej części molekuły enzymu, a miałoby jedynie charakter adsorbensu dla enzymu, to byłoby do pomyślenia, że azbest po pewnym czasie, przy kolejnem adsorbowaniu na nim białka i enzymu, nasyci się niejednocześnie białkiem wzgl. enzymem. Możnaby więc osiągnąć taki stan, że azbest nie adsorbowałby więcej białka, a adsorbowałby jeszcze enzym, lub też odwrotnie—po „nasyceniu" się enzymem przestałby go adsorbować, a wiązałby powierzchniowo w dalszym ciągu białko. W pierwszym wypadku otrzymanoby płyn zawierający białko a pozbawiony enzymu, w drugim zaś płyn poddawany adsorbcji zawierałby enzym, przy nieobecności substancyj białkowych.

To jednak mogłoby nastąpić jedynie w wypadku, gdyby azbest posiadał różną zdolność adsorbcyjną w stosunku do enzy-

mu i białek. Przy jednakowej zdolności adsorbowania tych dwóch ciał, ich oddzielenie od siebie drogą adsorbcji nie może dać wyników pozytywnych.

Doświadczenie było przeprowadzone w ten sposób, że na określonej ilości azbestu (Merck'a do analiz) adsorbowano 1 litr surowego wyciągu słodowego czterokrotnie. Przy każdej adsorbcji wytrząsano dokładnie mieszaninę azbestu z wyciągiem i pozostawiano na 24 godz. Po tym czasie sączono. W przesączu oznaczano: 1) azot całkowity met. Kjeldahla, 2) obecność białka odczynnikiem Essbacha, 3) procentową zawartość suchej substancji i 4) siłę enzymatyczną, mierzoną ilością powstałych cukrów redukujących metodą Bertranda.

Wyniki ilustruje tablica VI.

TABLICA VI.

	sucha m. w %-ach	N całk. w % s. m.	Cu w mg	Obecn. białka
wyciąg wyjściowy	1,39	3,2	136,8	+
„ po I-ej ads.	1,37	2,9		+
„ po II-ej ads.	1,37	2,7	131,3	+
„ po III-ej ads.	1,37	2,7	120,4	+
„ po IV-ej ads.	1,39	2,6	123,8	+

Z tablicy wynika, że nie udało się osiągnąć takiego punktu, kiedy bądź białko, bądź enzym jużby nie podlegał adsorbcji przez azbest. Procesy te zachodzą równolegle. Wszystkie badane przesącze zawierały i białko i enzym. Z procentowej zawartości azotu możnaby wnioskować, że część białka uległa adsorbcji, ale proces ten już po II-ej adsorbcji przestał się posuwać naprzód, — to samo mniej więcej zachodzi z enzymem.

Po pierwszej adsorbcji ilość enzymu nieznacznie się zmniejszyła, ale zaczynając od trzeciej adsorbcji już nie ulegała zmianie. Ta równoległość w procesie adsorbcji enzymu i białka daje się wytłómaczyć tylko wówczas, jeśli założymy, że enzym jest substancją białkową, a nie tylko zaadsorbowaną na białku.

Zaadsorbowany na azbeście enzym udało się zeń eluować stosując readsorbcję fosforanami według Willstaettera. Eluat ten jednak znów obok enzymu zawierał białko. Próby z odczynnikiem

Essbacha i Millona wypadły dodatnio, — ninhydrynowa — ujemnie. Pozatem eluat zawierał węglowodany.

Adsorbcja na węglu aktywowanym.

Adsorbcja na węglu była wielokrotnie stosowana w pracach nad izolowaniem enzymów wogóle, a diastazy w szczególności. Stosowano jednak zawsze węgiel zwierzący. Między innymi Michaelis i Ehrenreich (12) w swoich doświadczeniach nad adsorbcją enzymów, mających za cel określenie charakteru elektrochemicznego badanych enzymów, stosowali również węgiel zwierzęcy (kostny i krwi). Diastaza roślinna ulegała u tych badaczy całkowitej adsorbcji na węglu, przy zastosowaniu odczynu obojętnego lub kwaśnego.

W naszym wypadku, ze względu na bardzo silnie rozwinięte siły powierzchniowe węgla aktywowanego, użyto ten ostatni celem oczyszczenia drogą adsorbcji diastazy z wyciągu słodowego.

Do adsorbcji użyto wyciąg przygotowany w sposób poprzednio podany. Był on częściowo pozbawiony białka, siłę enzymatyczną wykazywał jednak równą wyciągowi wyjściowemu. Stosowano węgiel aktywowany Kahlbauma. Adsorbcja odbywała się w środowisku o pH = ± 5.

Zastosowano 3 różne ilości adsorbentu:

1. 8,1327 gr.
2. 3,1255 gr.
3. 1,7326 gr.

Każdą z powyższych ilości węgla zalano 100 ccm. wyciągu i po skłóceniu zostawiono w temp. pokojowej na 14 godzin. Po tym czasie sączono.

Okazało się, że w pierwszej i drugiej próbie cały enzym został zaadsorbowany, a wraz z nim również całkowicie białko z wyciągu. Płyn po przesączeniu był całkowicie bezbarwny i klarowny. Nie wykazywał on żadnej zdolności hydrolitycznej wobec skrobi, taksamo wszystkie zastosowane próby na wykrycie białka a więc: odczynnikiem Essbacha, Millona i ksantoproteinowa — dały wynik ujemny. Próba trzecia zawierała ilość węgla zbyt małą do zaadsorbowania w tych warunkach całkowitej ilości enzymu i białka z wyciągu. Otrzymano w tym wypadku płyn rozkładający skrobię i zawierający białko.

Różnice te ilustruje tablica VII:

TABLICA VII.

Nr. próby	enzym w przes.	enzym w ads-cie	białko w przes.	pH przes.
1	—	+	—	5,27
2	—	+	—	4,95
3	+++	+	+	4,81

Różnicy w działaniu hydrolitycznem wyciągów 1-go, 2-go i 3-go nie można położyć na karb nieodpowiedniego pH. We wszystkich trzech płynach pH było zawarte w granicach optimum.

Znów więc ten tylko przesącz rozkłada skrobię, który zawiera przynajmniej w minimalnej ilości białko.

Dla wyizolowania zaadsorbowanego enzymu z adsorbentów zastosowano następujące środki do readsorbcji:

1. wodę destylowaną pH — 5,0,
2. glicerynę 100%-ową pH — 4,7,
3. wodę dest. zakwaszoną HCl pH — 3,9,
4. wodę dest. zalkalizowaną NaOH pH — 8,2,
5. glicerynę 100%-ową zakw. HCl pH — 4,0,
6. glicerynę 100%-ową zakw. NaOH pH — 8,4.

Po 16-u godzinach oddzielono eluaty od węgla, sącząc przez azbest. Otrzymane przesącze sprawdzono na obecność białka odczynnikiem Essbacha i na obecność enzymu. Tak samo sprawdzono, czy węgiel pozostały po adsorbcji zawiera enzym.

Wyniki ilustruje tablica VIII:

TABLICA VIII.

Nr. węgla	eluow. przez	pH eluantu	pH eluatu	enzym w eluacie	enzym w węglu	białko w eluacie	rozkł.p. eluat pH	rozkł.p węgiel pH
1	H_2O dest.	5,0	3,7	—	—	±	4,3	5,1
2	glicer.	4,7	3,7	—	+		4,3	
3	glicNaOH	8,4	4,3	±	+		5,2	
4	„ HCl	4,0		+	+		4,3	
5	HCl	3,9	3,5	—	±	—	4,9	4,6
6	NaOH	8,2	4,7	—	—	—	5,2	4,3

Okazuje się więc, że najlepszym środkiem do readsorbcji enzymu z węgla jest gliceryna, zakwaszona kwasem solnym do pH = 4,0. Eluat, otrzymany przez readsorbcję gliceryną z kwasem solnym, poddano dalszemu procesowi oczyszczania. Najprzód uległ dializie. Po dwóch dniach, gdy płyn dializowany nie wchłaniał więcej wody, odparowano go w próżni w temp. 40° C. do objętości równej połowie objętości przed dializą.

Jego siła enzymatyczna w porównaniu z surowym wyciągiem słodowym była około 100 razy zmniejszona.

suchej substancji zawierał — 0,015%,

próby z odczynnikiem Essbacha, Millona, ninhydrynowa — ujemne. Dawał natomiast reakcję na węglowodany odczynnikiem Molischa i na curky redukujące odczynnikiem Fehlinga. Otrzymano więc w rezultacie płyn, niewykazujący reakcji dodatniej na białko, a czynny enzymatycznie. Brak reakcji dodatniej na białko skłonni jesteśmy jednak w tym wypadku tłómaczyć nie charakterem niebiałkowym enzymu, a zbyt małą jego ilością, by dało się ono stosowanemi metodami wykryć. Otrzymany płyn enzymatycznie czynny zawierał 0,15 mg. suchej masy w 1 ccm. Gdyby substancję tę stanowiło tylko białko, to jak to wynika z tabelki na stronicy 172, wszystkie wymienione wyżej odczynniki dałyby odczyn dodatni. Tak jednak nie jest, płyn badany zawiera, jak to wspomniano wyżej, węglowodany. Nie zostało stwierdzone jaką część suchej masy stanowią one, uwzględniając jednak małą czułość odczynnika Fehlinga, należy przypuszczać, że dość znaczną — wobec tego, ewentualna zawartość białka w suchej masie spada poniżej 0,1 mg. w 1 ccm, a wtedy jak wiemy odczynniki na białko dają już wyniki wątpliwe.

Adsorbcja metodą Willstaettera.

Ostatnia serja doświadczeń obejmowała próby oczyszczenia enzymu słodowego metodą Willstaettera, podaną przez niego dla amylazy trzustkowej.

Jako adsorbens służył wodorotlenek glinu, przygotowany według przepisu Willstaettera dla gatunku oznaczonego przez niego jako „Tonerde B".

Płyn do readsorbcji składał się z:
500 ccm. 1%-owego $(NH_4)_2HPO_4$,
25,4 ccm. norm. NH_4OH,
350 ccm. wody dest.

Próbom na adsorbcję poddano wyciąg słodowy niedializowany i dializowany.

Wyciąg niedializowany.

Siła tego wyciągu oznaczona metodą Willstaettera równała się 0,02 „Am. E." (Willstaetterowskich), t. j. w 20 ccm. była zawarta 1 Am. E. (jednostka amylolityczna). Adsorbcja przebiegała w odczynie obojętnym z dodatkiem 50% alkoholu etylowego.

Do 2 ccm. wodorotlenku glinu dolewano 24 ccm. 96%-owego alkoholu etylowego i 20 ccm. wyciągu słodowego. Wszystko to dokładnie mieszano, rozlewano do próbówek i poddawano 15-minutowemu wirowaniu. Wodorotlenek glinu wraz ze składnikami zaadsorbowanemi, zbijał się na dnie próbówki w twardy, zbity osad. Odciągano wtedy pipetą płyn z ponad osadu i do osadu dolewano mieszaninę readsorbującą. Po mocnem skłóceniu z płynem readsorbującym, poddawano znów 15-minutowemu wirowaniu i odciągano płyn z ponad osadu.

Oba zebrane płyny, t. j. płyn po adsorbcji i płyn po readsorbcji poddano próbom na zdolność rozkładania skrobi. Okazało się, iż oba one zawierają enzym, przyczem pierwszy z nich 6-ciokrotnie więcej niż drugi i przytem nie o wiele mniej, niż wyciąg poddany adsorbcji. Adsorbcja enzymu była więc w tych warunkach doświadczenia, bardzo niekompletna, prawdopodobnie niekompletna była również i readsorbcja. Wobec tego poddano płyn z pierwszej adsorbcji adsorbcji powtórnej, stosując technikę podobną do poprzedniej, jedynie zwiększając czterokrotnie ilość używanego wodorotlenku glinu.

Wynik otrzymany był podobny do poprzedniego. Enzym rozdzielił się pomiędzy oba płyny — część przeszła do readsorbentu, część zaś nie uległa wcale adsorbcji i znajdowała się w płynie zebranym z ponad wodorotlenku glinu. Przytem znów więcej go było w płynie drugim niż w pierwszym. A więc adsorbcja w dalszym ciągu zachodziła bardzo niecałkowicie.

Proces ten przeprowadzono po raz trzeci z wynikiem takim samym, ale tym razem ilość enzymu w płynie z ponad osadu była już znacznie mniejsza. Wreszcie po zastosowaniu następnej, a więc czwartej adsorbcji, otrzymano enzym głównie w readsorbacie, w płynie adsorbowanym było go już bardzo mało.

Wszystkie zebrane readsorbaty zlano razem, odparowano w próżni przy 40° C. do pierwotnej objętości wyciągu wziętego do

adsorbcji, t. j. do 20 ccm. i oznaczono według Willstaettera zawartość w nich enzymu.

Otrzymano $^1/_3$ „Am. E." zamiast 1 „Am. E.", a więc przy tych wszystkich operacjach 66% enzymu zostało utracone. Straty te należy położyć na karb niecałkowitej adsorbcji i readsorbcji i na karb uszkodzenia samego enzymu, prowadzącego aż do jego rozkładu.

Otrzymany płyn enzymatycznie czynny wykazywał jednak zawartość cukrów redukujących i białek.

Wyciąg dializowany.

Poddano adsorbcji wyciąg poprzednio dializowany, a więc częściowo pozbawiony substancyj towarzyszących enzymowi. Zawierał on cukry redukujące i białka, ale w ilości znacznie mniejszej niż wyciąg surowy. Adsorbcję przeprowadzano metodą taką samą jak poprzednio, tylko w dwóch różnych odczynach przy pH — 7 i pH — 4.

Adsorbowano daną próbę czterokrotnie. Readsorbaty otrzymane zlano razem i odparowano w próżni przy 40° C. do pierwotnej objętości. Wobec tego, iż doświadczenie z wyciągiem niedializowanym wykazało, że readsorbcja nie zachodzi w warunkach stosowanych całkowicie, zmieniono metodę o tyle, że po nalaniu readsorbującego płynu do osadu nie wirowano odrazu, lecz po 48-u godzinach. Wpłynęło to dodatnio na wynik. Po tak przeprowadzonej readsorbcji osady nie zawierały enzymu wcale, enzym przechodził całkowicie do płynu readsorbującego. Readsorbaty po odparowaniu poddano dializie dla usunięcia fosforanu amonu i ewentualnych resztek alkoholu.

Zbadano teraz funkcję enzymatyczną otrzymanego readsorbatu w porównaiu z wyciągiem dializowanym poddanym adsorbcji. Wykonano to, ze względu na małą ilość materjału, tylko metodą Wohlgemutha, a więc prześledzono jedynie całokształt rozkładu skrobi. Rozkład odbywał się przy pH 6,5;

po 5-ciu godz.:
readsorbat nie spowodował jeszcze żadnego rozkładu,
płyn wyjściowy rozłożył skrobię do barwy czerwonej;
po 24-u godz.:
readsorbat rozłożył skrobię do barwy czerwonej,
płyn wyjściowy — do barwy żółtej.

W ciągu następnych trzech dni rozkład skrobi przez readsorbat postąpił nieco dalej, ale jeszcze po upływie 6-ciu dni nie był zakończony.

Otrzymany więc płyn, w porównaiu z wyjściowym wyciągiem dializowanym, jest wielokrotnie słabszy, zawiera około 30—40 razy mniej enzymu. Próby na zawartość węglowodanów i białek wypadły następująco:

	odcz. Millona	odcz. Essbacha	odcz. Molischa
adsorbcja przy pH 4, readsorbat	—	—	?
„ „ pH 7, „	—	—	?
wyciąg dializow., wyjściowy	+	+	±

Ze względu na jednakowe zachowanie się i pod względem enzymatycznym i chemicznym readsorbatów z adsorbcji w środowisku kwaśnem i obojętnem, zlano je razem i znów porównano ich działanie na skrobię z wyciągiem wyjściowym użytym do adsorbcji.

Doświadczenie przebiegało w temp. 42° C.:

próba 1-sza zawierała 50 ccm skrobi 2%-owej + 3 ccm wyc. dializowanego

próba 2-ga zawierała 50 ccm skrobi 2%-owej + 5 ccm readsorbatu

po 24-u godz.

w 10-ciu ccm próby 1-ej było 140 mg cukru redukującego (maltozy)

w 10-ciu ccm „ 2-ej „ 7,5 mg „ „ „

enzymu w readsorbacie jest więc około 20-krotnie mniej.

DYSKUSJA.

Reasumując wyniki wszystkich przytoczonych doświadczeń, dochodzimy do wniosku sprzecznego z hipotezą szkoły Willstaettera, a zgodnego z poglądami Osborne'a, Wróblewskiego, Biedermana, Shermana i wielu innych.

Wynikałoby więc, że enzym diastatyczny, występujący w ziarnach jęczmienia, zawiera białko, należące do typu albumin. Wyników naszych doświadczeń nie można jednak bez zastrzeżeń porównywać z wynikami Willstaettera, ze względu na to, że przedmiotem badań wyżej wspomnianego autora była amylaza trzustkowa, a nie słodowa, — dotychczas zaś nikt jeszcze nie wykazał, że dwa te enzymy są substancjami identycznemi.

Pomijając tę kwestję, można pracom szkoły Willstaettera, a przynajmniej niektórym z nich, uczynić zarzut w naszem mniemaniu bardzo poważny.

Willstaetter i jego szkoła opierali się przy wnioskowaniu o charakterze chemicznym otrzymanych przez nich preparatów enzymatycznych, na występowaniu, względnie braku reakcji dodatniej z odczynnikami białkowemi, głównie z odczynnikiem Millona. Tu jednak kryje się poważne źródło błędu. Operowanie zbyt małemi ilościami może doprowadzić do wniosków wręcz fałszywych.

Przeglądając prace Willstaettera można się natknąć na liczby, wskazujące iż to przypuszczenie nie jest bezpodstawne.

I tak nprz. Waldschmidt-Leitz i Hesse (25) w pracy nad amylazą trzustkową otrzymali końcowy preparat w ilo'ci 2 mg. Do prób brali 0,1 mg. substancji. Jak wynika z danych na str. 172, ilość taka daje pewny wynik dodatni z odczynnikiem Millona. Trudno jednak przypuścić, by w cytowanym wypadku całą suchą masę stanowiło białko, zawsze przecież występują substancję o charakterze węglowodanów. Tak więc ilość białka, jeśli było ono obecne, wynosiło mniej niż 0,1 mg, a wtedy reakcja z odczynnikiem Millona daje wyniki zbyt niepewne, by na jej podstawie można było wnioskować o charakterze chemicznym badanego ciała. Jest więc zupełnie możliwem, iż w otrzymanym przez autorów preparacie białko było obecne, ale uszło uwagi badaczy wskutek nieuwzględnienia przez nich ograniczonej czułości reaktywów stosowanych.

Według Willstaettera enzym składa się z koloidalnego nosiciela i z grupy enzymatycznie czynnej, przyczem Willstaetter nie mówi nic bliższego o charakterze chemicznym tego nosiciela. Wszystkie inne ciała, występujące wraz z enzymem po jego wyodrębnieniu, jak białko, węglowodany i inne, uważa za substancje towarzyszące, nazwane przez niego „Begleitstoffe".

Z naszych doświadczeń wynika, że nie wszystkie ciała występujące wraz z enzymem, mogą ulec oddzieleniu od niego, bez spowodowania głębokich zmian w funkcji badanego enzymu. Nie wszy tkie więc one dadzą się podciągnąć pod termin „Begleitstoffe". Bardziej racjonalne byłoby tu wprowadzenie terminu Fodora (5) „Fermentträger" dla tych zpośród substancyj towarzyszących, usunięcie których powoduje zanik, lub silne osłabienie funkcji enzymatycznej. W naszym wypadku część substancyj białkowych, występujących wraz z enzymem w wyciągu słodowym. daje się stosunkowo łatwo oddzielić odeń, przyczem nie jest to po-

wiązane ze zmianami w funkcji enzymatycznej badanej diastazy,— stanowiłyby więc one „Begleitstoffe" — substancje — ciała towarzyszące w ścisłem tego słowa znaczeniu. Pewien jednak składnik tych substancyj, mianowicie białko rozpuszczalne w czystej wodzie, a więc typu albumin — ma już znaczenie inne. Ulega ono bardzo trudno oddzieleniu od czynnego enzymatycznie kompleksu i usunięcie go prowadzi za sobą zanik funkcji enzymatycznej tego kompleksu. Proces ten należałoby więc raczej nazwać rozbiciem istniejącego związku, niż oddzieleniem odeń składnika białkowego.

Ten składnik należałoby więc traktować inaczej. Może to być: 1) „Fermentträger" w znaczeniu Fodora, bądź 2) jeden ze składników koloidalnego nosiciela enzymu, w sensie Willstaettera, bądź też wreszcie 3) istotny składnik grupy enzymatycznie czynnej.

W każdym razie pozostaje pewnem, że frakcja białek rozpuszczalnych w wodzie, występujących wraz z enzymem diastatycznym w wyciągu słodowym, ma dla jego funkcji znaczenie istotne i niezbędne.

Pozostaje tylko niewyjaśnione, w jaki sposób substancja ta jest powiązana z enzymem, czy jest to związek o charakterze chemicznym, czy fizyko-chemicznym.

WNIOSKI.

1. Enzym diastatyczny występujący w słodzie jest zawarty w frakcji wodnej wyciągu słodowego, a więc występuje razem z białkami słodu rozpuszczalnemi w wodzie.

2. Zpośród tych białek jedynie albumina, białko rozpuszczalne w wodzie pozbawionej elektrolitów, stoi w bliższym związku z enzymem. Wykazuje to dializa i frakcjonowane strącanie białek z wyciągu.

3. Oczyszczanie enzymu drogą adsorbcji na: bibule, azbeście, węglu aktywowanym i wodorotlenku glinu, prowadzi do płynów, wykazujących czynność enzymatyczną dopóty, dopóki występują w nim ilości białka dające się wykryć normalnie stosowanemi reaktywami. Usunięcie resztek substancyj białkowych, aż do zaniku reakcyj białkowych, powoduje całkowity zanik funkcji enzymatycznej, bądź jej wielokrotne osłabienie.

4. Białkiem niedającem się odzielić od enzymu, bez spowodwania głębokich zmian w jego funkcji, a więc związanem z nim

w sposób praktycznie nierozdzielny, — jest białko należące do grupy albumin.

Niech mi wolno będzie wyrazić głębokie podziękowanie Panu prof. Dr. K. Bassalikowi, pod kierunkiem którego praca ta została wykonana, za Jego cenną pomoc i wskazówki.

BIBLJOGRAFJA.

1. Biedermann W. Die organische Komponente der Diastase und das wahre Wesen der Autolyse der Stärke. Fermentforschung. **4**, 359, 1921.
2. Effront J. Sur l'absorption de la pepsine par les papiers a filtrer. Comptes rend. de la Soc. de Biol., **87**, 1058, 1922.
3. Euler H. u. Svanberg O. Über die Charakterisierung v. Amylaselösungen. Ztschr. f. physiol. Chemie, **112**, 193, 1921.
4. Flancerówna G. Wpływ jonów na amylazę roślinną. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, **7**, 521, 1930.
5. Fodor A. u. Frankenthal L. Über das Wesen der Fermentwirkung im allgemeinen. Bioch. Ztschr., **228**, 101, 1930.
6. Fraenkel S. u. Hamburg M. Über Diastase I Mitteilung. Versuche zur Herstellung von Reindiastase und deren Eigenschaften. Beiträge z. chem. Physiologie u. Pathologie, **7**, 389, 1906.
7. Fricke R. u. Kaja U. Über Fermentreinigung durch Elektro-Dialyse und Elektro-Osmose, I-Malzdiastase. Berichte d. deutsch. chem. Ges., **57**, 310, 1924.
8. Fricke R. u. Kaja P. Über die Reinigung von Malzdiastase durch Elektro-Dialyse u. Elektro-Osmose, II Mitteilung. Berichte d. deutsch. chem. Ges., **57**, 765, 1924.
9. Luers H. u. Sellner E. Beiträge zur Reinigung der Malzamylase. Wochenschr. f. Brauerei, **42**, 97, 1925.
10. Luers H. u. Sellner E. Beiträge zur Reinigung der Malzamylase. Wochenschr. f. Brauerei, **42**, 103, 1925.
11. Luers H. u. Sellner E. Beiträge zur Reinigung der Malzamylase. Wochenschr. f. Brauerei, **42**, 110, 1925.
12. Michaelis L. u. Ehrenreich M. Die Adsorptionsanalyse der Fermente. Bioch. Ztschr., **10**, 283, 1908.
13. Osborne a. Campbell. Journ.of the am. chem. Soc., **17**, 587, 1895.
14. Osborne a. Campbell. Journ. of the am. chem. Soc., **18**, 536, 1896.
15. Pearsall W. H. a. Ewing J. The isoelectric points of some plant proteins. The bioch. Journ., **18**, 329, 1924.
16. Fribram E. Über Diastase II. Weitere Versuche zur Herstellung von Reindiastase u. deren Eigenschaften. Bioch. Ztschr., **44**, 293, 1911.
17. Sherman H. C. a. Schlesinger M. D. Studies on amylases III. Experiments upon the preparation a. properties of pancreatic amylase. Journ. of. amer. chem. Soc., **33**, 1195, 1911.

18. Sherman H. C. a. Schlesinger M. D. Studies on amylase IV. A further investigation of the properties of pancreatic amylase. Journ. amer. chem. Soc., **34,** 1104, 1912.
19. Sherman H. C. a. Schlesinger M. D. Studies on amylase X. Further experiments upon the purification of malt amylase. Journ. amer. chem. Soc., **37,** 643, 1915.
20. Sherman H. C. a. Schlesinger M. D. Studies an amylase X. Comparison of certain properties of pancreatic a. malt amylase preparations. Journ. amer. chem. Soc., **37,** 1305, 1915.
21. Sherman H. C., Caldwell M. L., Mildred Adams. Enzyme purification. Further experiments with pancreatic amylase. Journ. biol. Chem., **88,** 295, 1930.
22. Sherman H. C., Caldwell M. L., Doebbeling S. E. Further studies upon the purification a. properties of malt amylase. Journ. biol. Chem., **104,** 501, 1934.
23. Wróblewski A. Über die chem. Beschaffenheit der Diastase und über die Bestimmung ihrer Wirksamkeit. Ztschr. f. physiol. Chemie **24,** 173, 1898.
24. Wróblewski A. Über die chemische Beschaffenheit der amylolytischen Fermente. Ber. d. deutsch. chem. Ges. **31** (II), 1130, 1898.
25. Waldschmidt-Leitz E. u. Reichel M. Zur Frage nach der chemischen Natur der Pankreasamylase. Ztschr. f. physiol. Chemie **204,** 197, 1932.
26. Willstaetter R. u. Waldschmidt-Leitz E. Über Pankreaslipase. II. Abhandlung über Pankreasenzyme. Ztschr. f. physiol. Chemie, **125,** 132, 1923.
27. Willstaetter R., Waldschmidt-Leitz E., Hesse A. R. F. Über Pankreasamylase. III. Abhandlung über Pankreasenzyme. Ztschr. f. physiol. Chemie, **126,** 143, 1923
28. Willstaetter R., Waldschmidt-Leitz E., Hesse A. R. F. Über das Adsorptionverhalten der Pankreasamylase. Ztschr. f. physiol Chemie, **142,** 14, 1925.
29. Willstaetter R. Über Fortschritte in der Enzymisolierung. Ber. d. deutsch. chem. Ges., **59** 1, 1926.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die chemische Natur des amylolytischen Enzyms, welches in der keimenden Gerste auftritt, bleibt noch unaufgeklärt. Es ist fraglich, ob die amylolytische Wirkung des Malzauszuges an die in ihm vorhandenen Eiweiszstoffe gebunden ist, oder ob sie von ihnen unabhängig ist.

Zwecks Entscheidung dieser Frage, wurde eine Trennung des Enzyms von den Eiweiszstoffen mittels folgender Methoden versucht:

1. Dialyse,

2. fraktionierte Extraktion des Enzyms aus dem Malz,

3. fraktioniertes Ausfällen der Eiweiszstoffe bei verschiedenem pH,

4. Adsorption.

Zwecks Bestimmung der enzymatischen Wirkung der untersuchten Malzauszüge wurde die Methode nach Wohlgemuth und die unmittelbare Bestimmung des Zuckers nach Bertrand angewandt.

Die Hauptergebnisse vorliegender Untersuchungen lassen sich folgenderweise zusammenfassen:

1. Bei der Dialyse des Malzextraktes fällt, wenn die Mineralbestandteile fast gänzlich aus dem Dialysat entfernt worden sind, ein bräunlicher, klebriger Niederschlag aus, der hauptsächlich aus Eiweiszstoffen, und zwar aus in HCl und in NaCl löslichen Globulinen, besteht.

Diese Fraktion der Malzeiweiszstoffe enthält keinen enzymatisch tétigen Stoff (vgl. Tab. I p. 176). Die von diesem Niederschlag getrennte Lösung ist enzymatisch wirksam, enthält aber noch viel Eiweiszstoffe. Die Wirkung dieser Lösung wird aber durch Entfernung der Elektrolyte bedeutend abgeschwächt; durch Zugabe von Malzextraktasche lässt sie sich nicht vollständig restituieren.

Man kann infolgedessen annehmen, dass diese Abschwächung einerseits durch den Mangel an Elektrolyten als Aktivatoren des Enzyms, andererseits aber durch Änderung der Dispersion des Komplexes Eiweiszstoffe-Enzym, verursacht ist.

Die Dialyse - Versuche beweisen jedenfalls eindeutig, dass das amylolytische Enzym des Gerstenmalzes nicht an die Globulin - Fraktion, sondern an andere Eiweiszsubstanzen des Malzextraktes gebunden ist.

2. Es wurde darum eine fraktionierte Extraktion des Enzyms versucht, die unter Anwendung der nachstehenden Extraktionsmittel ausgeführt worden war:

a. Alkohol 95%, hernach,

b. destilliertes Wasser, dann,

c. KOH 0,2% und zuletzt,

d. NaCl 10%.

Alle auf diese Weise erlangten Extrakte enthielten Eiweiss, aber nur der wässerige Extrakt vermochte Stärke zu hydrolisieren; die übrigen waren enzymatisch unwirksam (vgl. p. 179).

Daraus kann man schliessen, dass das Enzym an *diejenigen* Eiweiszkörper gebunden ist, welche in *elektrolytfreiem Wasser löslich* sind, d. h. an albuminähnliche Substanzen.

3. Zwecks Trennung der verschiedenen, im Malzauszuge vorhandenen Eiweiszstoffe, wurde eine fraktionierte Fällung der letzteren bei verschiedenem pH angewandt; hierzu wurde Essigsäure wechselnder Konzentration gebraucht.

Bei *allen* ausgeführten Fällungen (bei pH 2,7 bis 6,0) erfolgte eine teilweise Ausféllung, bei *keinem* pH aber war sie vollständig.

Die Fällung der einzelnen Eiweiszstoffe erfolgt beim Erreichen ihrer isoelektrischen Punkte. Da aber diese isoelektrischen Punkte nahe aneinander liegen, und, da bei der Fällung durch Okklusion auch andere Eiweiszstoffe mitgerissen werden, — war es unmöglich mit Hilfe dieser Methode die einzelnen Fraktionen voneinander völlig zu trennen.

Die enzymatische Wirkung der von den Niederschlägen abzentrifugierten Flüssigkeiten war stark abgeschwächt, mit Ausnahme der bei pH 4,66 und 4,88 erhaltenen Flüssigkeiten, deren amylolytische Wirkung unverändert, d. h. gleich der des Ausgangsmaterials, blieb. Daraus folgt, dass die bei pH 4,66 und 4,88 ausgefällten Einweiszstoffe in der enzymatischen Funktion des Malzes keinen Anteil nehmen (vgl. p. 184).

Auf Grund der Untersuchungen anderer Forscher (Pearsall und Ewing, 14) kann man annehmen, dass bei diesem pH die Albumine des Gerstenkornes nicht gefällt werden.

Aus dieser Versuchsserie lässt sich wiederum mit grosser Wahrscheinlichkeit schliessen, dass die enzymatische Funktion an *albuminähnliche* Stoffe gebunden ist.

4. Schliesslich wurde noch die Adsorption zur Trennung des Enzyms von den Eiweiszstoffen ausgeführt.

Folgende Adsorbentia wurden benutzt:

a. Filtrierpapier,
b. Asbest,
c. aktivierte Kohle und
d. Tonerde nach Willstätter.

Die erhaltenen Resultate stimmten insofern mit den vorigen überein, dass es nicht gelungen ist, das Enzym von den Eiweiszsubstanzen zu trennen.

In allen mit den oben erwähnten Adsorbentien ausgeführten Versuchen erfolgte die Adsorption des Enzyms gleichzeitig

mit der der Eiweiszstoffe. Nach mit verschiedenen Lösungen ausgeführter Readsorption, waren die Flüssigkeiten zwar enzymatisch aktiv, enthielten aber stets Eiweiss (vgl. Tab. VI, VII, p. 186, 188).

Mehrmals wiederholte Adsorptionen und Readsorptionen führten zwar zur weiteren Entfernung der Eiweiszstoffe aus der Lösung, zugleich aber bewirkten sie eine Abschwächung der enzymatischen Funktion. Mit dem Verschwinden der Eiweiszreaktion verschwand auch vollständig die enzymatische Wirkung. In einzelnen Fällen liess sich allerdings noch eine äusserst schwache enzymatische Wirkung, — aber stets nur nach Ablauf von mindestens 24 Stunden und nur bis zur Dextrinphase — nachweisen, obwohl mit den üblichen Reagenzien keine Eiweiszreaktion mehr auftrat, — vermutlich infolge zu grosser Verdünnung. Hierzu ist aber zu sagen, dass die Eiweiszreagenzien viel weniger empfindlich sind als die Probe der biologischen enzymatischen Wirkung. Die geringste Ovalbuminmenge, die ich noch mit Millons Reagenz in 1 ccm H_2O habe nachweisen können, betrug 0,1 mg — (vgl. Tab. p. 172). Es ist darum sehr wahrscheinlich, dass in jenen Lösungen, die die oben angegebene überaus schwache enzymatische Wirkung zeigten, sich noch Albumine in Mengen von unter 0,1 mg befanden — mit deren Anwesenheit die sehr schwache enzymatische Wirkung verbunden war.

Die oben referierten Versuche bestätigen die Auffassung, dass Eiweiszstoffe einen unentbehrlichen Faktor der amylolytischen Funktion bilden. Dies bezieht sich aber, den besprochenen Versuchen gemäss, nur auf die in Wasser löslichen, albuminähnlichen Substanzen.

Die Resultate obiger Versuche geben aber keinen Aufschluss über die Natur der Verbindung zwischen Albumin und Enzym. Es bleibt weiterhin unaufgeklärt, ob das Eiweiss einen Bestandteil der enzymatisch aktiven Gruppe bildet, oder ob es nur als Adsorbens für das Enzym dient.

Institut für Pflanzenphysiologie d. Universität Warschau.