

Über die optimale Wasserstoffionenkonzentration bei der Wirkung der Takadiastase.

Von

G. Kita und T. Kitano.

(Eingegangen am 9. Dez. 1929.)

Die optimale Wasserstoffionenkonzentration bei der amylolytischen Wirkung der Takadiastase wurde schon oftmals untersucht, aber die Resultate gehen auseinander. So gibt z. B. Oshima⁽¹⁾ 5.2 pH an, während andere⁽²⁾ 4.1-5.2 angeben.

Diese Abweichung dürfte natürlich sein, wenn man die Ursache der Wirkung der Wasserstoffionen und die Abweichung der Versuchsbedingungen in Betracht zieht, weil die Wasserstoffionen einerseits Enzym aktivierend, andererseits zerstörend einwirken und diese Effekte von den Umständen der Wirkung abhängen können. So kann die optimale Wasserstoffionenkonzentration bei der Wirkung der Enzyme im allgemeinen nicht eine absolute sein, sondern muss von den Bedingungen der Wirkung, z. B. Einwirkungstemperatur, -dauer, Konzentration der Enzyme, Zusammensetzung der Lösung usw. abhängen.

Mit dieser Absicht haben die Verfasser im Jahre 1925 einige Versuche angestellt, um die Verschiebung der optimalen Wasserstoffionenkonzentration bei der Wirkung der Takadiastase zu bestimmen.⁽³⁾

Kürzlich ist der Einfluss der Temperatur auf das pH-Optimum der Diastase beim Maischen von Windisch, Kolbach und Benedek⁽⁴⁾ mitgeteilt

1) Journ. Soc. Chem. Ind., Japan, **26**, 685 (1925).

2) Sherman, Thomas u. Baldwin; Journ. Amer. Chem. Soc., **41**, 231 (1919). K. Kane; Journ. Soc. Brew., Japan, **19**, No. 7 (1924), K. Matsumoto; Journ. Soc. Brew., Japan, **20**, No. 1 (1925), S. Sugiyama u. K. Matsushita; Report Brew. Inst., Japan, No. **93**, 308 (1925), K. Matsumoto u. K. Kubota; Report Brew. Inst., Japan, No. **94**, March (1926).

3) Journ. Soc. Chem. Ind., Japan, **29**, 415 (1926).

4) Wochenschr. f. Brauerei, **46**, 345 (1929).

worden. Dabei sind diesbezügliche Literaturangaben gemacht worden. Darunter erkennen Chrzaszcz, Bidzinski und Krause⁽⁵⁾ die Abhängigkeit des optimalen pH von der Temperatur bei der Dextrinierung der Stärke durch gereinigte Weizenmalzamyrase, während Lüers und Nishimura⁽⁶⁾ bei ihrem Versuch der Verzuckerung löslicher Stärke in Azetat-Puffergemischen mit einem Amylasepräparat die Abhängigkeit der optimalen $[H^+]$ nicht beobachteten. Nach Shermann, Cadwell und Adams⁽⁷⁾ ist die optimale $[H^+]$ bei der Verzuckerung löslicher Stärke in Azetat-Pufferlösung mit Malzdiastase unabhängig von der Wirkungstemperatur dieselbe, während sie in Phosphatpufferlösung von der Temperatur abhängt. So ist das Verhältnis verschiedenartig, aber nach unserer Meinung soll die Verschiebung der optimalen $[H^+]$ infolge der Temperatur, wie oben erwähnt, das allgemein gültige sein und die Unabhängigkeit derselben von der Temperatur eine Ausnahme von dem Gesetz, wo der Einfluss von besonderen Umständen durch Kompensation der gegenseitig wirkenden Effekte verdeckt ist, bilden.

Das Resultat unseres Versuches mit Takadiastase fügt diesem allgemeinen Gesetz ein Beispiel hinzu.

Beschreibung der Versuche.

Es wurden aus Kartoffelstärke nach Lintner hergestellte lösliche Stärke und käufliche Takadiastase verwendet.

Der gebildete Zucker wurde nach Bertrand bestimmt und als Glukose in 100 ccm ausgedrückt. Der Betrag zeigt keine wirkliche Zuckermenge, weil bei der Verzuckerung mit Takadiastase mindestens zwei Zuckerarten von Maltose und Glukose entstehen und ihre Mengenverhältnisse von den Bedingungen abhängen. Genaue Bestimmung beider Zuckerarten ist nicht einfach. So haben die Verfasser durch diese Methode den Verzuckerungsgrad verglichen. Das pH wurde bei der betreffenden Wirkungstemperatur elektrometrisch bestimmt.

5) Biochem. Ztschr., **160**, 155 (1925).

6) Wochenschr. f. Brauerei, **43**, 415 (1926).

7) Journ. Amer. Chem. Soc., **49**, 2000 (1927).

Die Lösungen wurden bereitet wie folgt.

(A) Pufferlösung: Die Pfefferlösung wurde so bereitet, dass sie MacIlvaineschen Lösung wird, wenn 100 ccm derselben auf 315 ccm verdünnt sind.

(B) Stärkelösung: 6 %ige lösliche Stärkelösung.

100 ccm Pufferlösung und 200 ccm Stärkelösung wurden zusammen gemischt, um 4 %ige Stärke-Pufferlösung zu erhalten. 200 ccm dieser Lösung wurden in einem Erlenmeyerschen Kolben genommen, einige Tropfen von Toluol zugesetzt und im Thermostat von betreffender Temperatur eingelegt. Nach 30 Minuten, wann die Lösung einer bestimmten Temperatur erreicht ist, wurden 10 ccm der 0,5 bzw. 0,1 %igen Takadiastaselösung zugesetzt, und nach je einer gewissen Zeitdauer wurden 10 ccm herauspipettiert. Die weitere Verzuckerung wurde gleich mit einer kleinen Menge von Alkalilauge gehemmt und nach der Verdünnung auf die bestimmten Volumen ihr Zuckergehalt bestimmt.

Von anderen 100 ccm 4 %iger Stärke-Pufferlösung nach dem Zusetzen von 5 ccm Diastaselösung wurde das pH am Anfang der Versuche bestimmt.

Versuchsergebnisse.

1) 200 ccm 4 %ige Stärke-Pufferlösung, 10 ccm 0,5 %ige Takadiastaselösung. Temperatur: $50 \pm 2^\circ\text{C}$.

Wirkungsdauer in Stunden Lösungs-Nr	Zuckermenge, mg Zucker als Glukose/100 ccm.							pH bei 50°C.		
	0.5	1	4	24	48	72	96	Am Anfang	Am Ende	Im Mittel
a ₁	628	824	1416	2310	2382	—	2460	4.333	4.348	4.34
b ₁	735	992	1515	2365	2538	—	2664	4.710	4.664	4.69
c ₁	795	1082	1572	2380	2568	—	2742	5.018	4.977	5.00
d ₁	822	1114	1602	2320	2574	—	2820	5.230	5.240	5.24
e ₁	816	1124	1605	2265	2490	—	2766	5.482	5.464	5.47
f ₁	781	1108	1596	2205	2406	—	2700	5.805	5.742	5.77
Opt. pH	5.24	5.47	5.47	5.00	5.24	—	5.24			

II) 200 ccm 4 %ige Stärke-Pufferlösung, 10 ccm 0.1 %ige
Takadiastaselösung. Temperatur: $50 \pm 2^\circ\text{C}$.

Lösungs-Nr	Wirkungsdauer in Stunden		Zuckermenge, mg Zucker als Glukose/100 ccm.					pH bei 50°C		
	0.5	1	4	24	48	72	96	Am Anfang	Am Ende	Im Mittel
a ₂	192	303	548	1262	1625	—	2028	4.950	4.961	4.96
b ₂	201	320	636	1348	1686	—	2044	5.251	5.221	5.24
c ₂	203	336	698	1372	1683	—	2004	5.469	5.446	5.46
d ₂	186	319	734	1352	1635	—	1952	5.720	5.720	5.72
e ₂	170	296	722	1314	1548	—	1852	6.000	5.978	5.99
f ₂	148	265	694	1208	1389	—	1680	6.289	6.250	6.27
Opt. pH	5.46	5.46	5.72	5.46	5.24	—	5.24			

III) 200 ccm 4 %ige Stärke-Pufferlösung, 10 ccm 0.5 %ige
Takadiastaselösung. Temperatur: $40 \pm 1^\circ\text{C}$.

Lösungs-Nr	Wirkungsdauer in Stunden		Zuckermenge, mg Zucker als Glukose/100 ccm.					pH bei 40°C		
	0.5	1	4	24	48	72	96	Am Anfang	Am Ende	Im Mittel
a ₃	617	890	1383	2415	2838	3094	—	—	3.907	3.91
b ₃	658	970	1530	2390	2844	3080	—	4.143	4.126	4.13
c ₃	673	1018	1610	2380	2814	3042	—	4.402	4.391	4.40
d ₃	681	1020	1628	2370	2754	2975	—	4.603	4.603	4.60
e ₃	680	1028	1642	2350	2676	2926	—	4.885	4.885	4.89
f ₃	664	1008	1638	2300	2592	2863	—	5.170	5.170	5.17
Opt. pH	4.60	4.89	4.89	3.91	4.13	3.91	—			

Mit der Lösung von kleinem pH als a₃ wurde die Verzuckerung untersucht und es wurde bestätigt, dass die Verzuckerung mit der Verringerung von pH kleiner wird und zwar nach 96 Stunden auch kleiner ist.

IV) 200 ccm 4 %ige Stärke-Pufferlösung, 10 ccm 0.1 %ige
Takadiastaselösung. Temperatur: $40 \pm 1^\circ\text{C}$.

Lösungs-Nr	Wirkungsdauer in Stunden		Zuckermenge, mg Zucker als Glukose/100 ccm.					pH bei 40°C		
	0.5	1	4	24	48	72	96	Am Anfang	Am Ende	Im Mittel
a ₄	263	385	866	1430	1744	2030	2209	4.470	4.470	4.47
b ₄	265	394	903	1533	1832	2033	2200	4.680	4.686	4.68
c ₄	262	392	961	1590	1800	2030	2176	4.964	5.077	5.02
d ₄	247	387	971	1593	1810	2012	2104	5.250	5.234	5.24

Wirkungsdauer in Stunden Lösungs-Nr	Zuckermenge, mg Zucker als Glukose/100 ccm.							pH bei 40°C		
	0.5	1	4	24	48	72	96	Am Anfang	Am Ende	Im Mittel
e ₄	246	358	946	1634	1805	1988	2088	5.553	5.553	5.55
f ₄	231	298	807	1375	1776	1968	2036	5.825	5.712	5.77
Opt. pH	4.68	4.68	5.24	5.55	4.68	4.68	4.47 (4.68)			

V) 200 ccm 4 %ige Stärke-Pufferlösung, 10 ccm 0.5 %ige
Takadiastaselösung. Temperatur: $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Wirkungsdauer in Stunden Lösungs-Nr	Zuckermenge, mg Zucker als Glukose/100 ccm.							pH bei 30°C		
	0.5	1	4	24	48	72	96	Am Anfang	Am Ende	Im Mittel
a ₅	299	339	646	1586	—	2420	2535	3.094	3.106	3.10
b ₅	454	748	1115	1848	—	2496	2590	3.675	3.833	3.75
c ₅	502	853	1330	1925	—	2488	2600	4.144	4.080	4.11
d ₅	501	881	1384	1923	—	2432	2520	4.678	4.690	4.68
e ₅	465	823	1348	1890	—	2312	2440	5.287	5.095	5.19
f ₅	343	671	1274	1803	—	2192	2310	5.705	5.845	5.78
Opt. pH	4.11	4.68	4.68	4.11	—	3.75 (4.11)	4.11			

VI) 200 ccm 4 %ige Stärke-Pufferlösung, 10 ccm 0.1 %ige
Takadiastaselösung. Temperatur: $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Wirkungsdauer in Stunden Lösungs-Nr	Zuckermenge, mg Zucker als Glukose/100 ccm.							pH bei 30°C		
	0.5	1	4	24	48	72	168	Am Anfang	Am Ende	Im Mittel
a ₆	183	263	637	1083	1368	1526	1806	4.027	3.897	3.96
b ₆	185	278	692	1339	1512	1666	1855	4.318	4.234	4.28
c ₆	192	—	710	1432	1600	1743	1904	4.485	4.432	4.46
d ₆	185	275	735	1463	1628	1778	1904	4.600	4.600	4.60
e ₆	188	272	721	1491	1644	1806	1904	5.071	4.987	5.03
f ₆	177	264	705	1495	1672	1771	1865	5.300	5.397	5.35
Opt. pH	4.46	—	4.60	5.35	5.35	5.03	4.46 -5.03			

Im Versuch V und VI war die Regulierung der Temperatur des Thermostates nach 72 Stunden schwierig. So haben die Werte nach diesem Zeitpunkt eine raue Bedeutung. Im Versuch VI wurde die Verzuckerung nach 96 Stunden bei Zimmertemperatur ausgeführt.

Aus diesen Resultaten kann man entnehmen, dass das optimale pH bei der Verzuckerung der löslichen Stärke mit Takadiastase von der Temperatur der Wirkung abhängt. Es schwankt auch während der Verzuckerung derselben Lösung. Darüber sind noch weitere Versuche nötig, um die Tendenz genau zu bestimmen. Aber man kann sagen, dass im allgemeinen das optimale pH mit der Temperatur der Verzuckerung ansteigt. Die Verdünnung der Takadiastaselösung übt auch einen Einfluss auf das optimale pH aus and verschiebt es etwas höher.
