



Over de scheiding en de werking der beide moutamylasen : een bijdrage tot de kennis van het zetmeel en zijn verhouding tot glycogeen

<https://hdl.handle.net/1874/300538>

G. A. VAN KLINKENBERG

OVER DE SCHEIDING
EN DE WERKING DER BEIDE
MOUTAMYLASEN



BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT

H. J. PARIS * AMSTERDAM

recht

OVER DE SCHEIDING EN DE WERKING
DER BEIDE MOUTAMYLASEN

*een bijdrage tot de kennis van het zetmeel
en zijn verhouding tot glycogeen*

THE SCIENCE OF THE MIND

THE SCIENCE OF THE MIND

THE SCIENCE OF THE MIND

THE SCIENCE OF THE MIND

THE SCIENCE OF THE MIND

RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT



1758 4479

OVER DE SCHEIDING EN DE WERKING DER BEIDE MOUTAMYLASEN

*een bijdrage tot de kennis van het zetmeel en zijn
verhouding tot glycogeen*

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN
GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUUR-
KUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE
UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNI-
FICUS, DR. L. S. ORNSTEIN, HOOGLEERAAR IN
DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE,
VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNI-
VERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE
FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE TE
VERDEDIGEN OP MAANDAG 30 NOVEMBER 1931,
DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

GERARDUS ANNE VAN KLINKENBERG
GEBOREN TE AMERONGEN

H. J. PARIS
AMSTERDAM MCMXXXI

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

AAN MIJN OUDERS
AAN MIJN AANSTAANDE VROUW

De voltooiing van dit proefschrift biedt mij de welkome gelegenheid, U, Oud-Hoogleraren en Hoogleraren aan de Rijksuniversiteit te Utrecht, van wie ik onderricht heb mogen ontvangen, daarvoor mijn welgemeenden dank te betuigen.

Hooggeleerde WENT, Hooggeachte Promotor, ik beschouw het als een groote eer, door U in de gelegenheid te zijn gesteld om dit onderzoek, waartoe Gij de aanleiding gaaft, in Uw Laboratorium te verrichten. Daarvoor en niet minder voor de bizondere belangstelling, welke Gij steeds in mijn werk getoond hebt, ben ik U zeer dankbaar. De prettige sfeer in het Botanisch Laboratorium, de gezellige uren ook, die ik in Uw gastvrij huis heb mogen doorbrengen, hebben deze jaren tot de aangenaamste van mijn studietijd gemaakt.

Hooggeleerde KRUYT, een groot voorrecht acht ik het, Uwe met zooveel geest voorgedragen colleges in de phasenleer en de kolloidchemie te hebben kunnen volgen. Bovendien hebt Gij eenige uren van Uw druk bezetten tijd willen afstaan voor enkele besprekingen betreffende mijn werk en voor het doorlezen van een deel van het manuscript van dit proefschrift, waarbij ik menige waardevolle raadgeving van U mocht ontvangen. Voor dit alles ben ik zeer erkentelijk.

Hooggeleerde COHEN, de eisch van exactheid in denken en handelen, welke Gij steeds aan Uwe leerlingen stelt op Uw colleges en practica in de physische chemie, is op mijn vorming van grooten invloed geweest; ik dank U daarvoor zeer.

Hooggeleerde RUZICKA, aan U heb ik een groot deel van mijn practische zoowel als theoretische vorming op het gebied van de organische chemie te danken.

Doch ook aan Uw colleges en practica, die ik in de eerste jaren van mijn studietijd gevolgd heb, Hooggeleerde VAN ROMBURGH, behoud ik steeds de aangenaamste herinnering.

Tenslotte zou ik een woord van dank willen richten tot het personeel van het Botanisch Laboratorium, dat mij in menig opzicht van dienst is geweest; in het bijzonder dank ik U, waarde A. DE BOUTER, voor de fraaie uitvoering der teekeningen.

INHOUD

I — INLEIDING

1 — Overzicht en beteekenis van het werk van WIJSMAN	1
2 — Overzicht van de belangrijkste literatuur na WIJSMAN voor zoover die de kwestie der beide amylasen betreft	7
3 — Doel en indeeling van het onderzoek	18

II — BEREIDING DER AMYLASE- EN ZETMEEL PRAEPARATEN.

1 — Nomenclatuur der beide enzymen	20
2 — Bereiding van α -moutamylase en α - β -moutamylase	21
3 — Bereiding van β -moutamylase	24
4 — Bereiding van oplosbaar zetmeel	25
5 — Uitvoering der diffusieproeven	26

III — DE INVLOED DER H-IONEN-CONCENTRATIE OP DE REACTIESNELHEID DER BEIDE AMYLASSEN.

1 — Inleiding	28
2 — Methodiek	31
3 — Voorbereidende werkzaamheden	34
4 — pH-kromme van β -moutamylase. Bereiding van erythrogr- nulose.	35
5 — pH-kromme van α -moutamylase	42
6 — pH-kromme van α - β -moutamylase	45

IV — DE INVLOED VAN α -MALTOSE EN β -MALTOSE.

1 — Inleiding.	48
2 — Uitvoering der proeven	49

V — DE INVLOED VAN DE ENZYMCONCENTRATIE OP DE REACTIESNELHEID EN DE GRENS VAN DE AFBRAAK.

1 — Proeven met β -moutamylase	52
2 — Proeven met α -moutamylase	58
3 — Proeven met α - β -moutamylase.	61

VI — VERKLARING DER AFBRAAKGRENZEN. PROEVEN
MET GLYCOGEEN.

1 — Verklaring der afbraakgrenzen	63
2 — Proeven met glycogeen	65
3 — Resultaten van andere onderzoekers	70
4 — Eenige bezwaren	72

VII — DE BEIDE COMPONENTEN VAN HET ZETMEEL EN
HUN VERHOUDING TOT GLYCOGEEN.

1 — Amylose, amylopektine en glycogeen	75
2 — Structuur van het zetmeelmolecule	82

VIII — SAMENVATTING 88

I

INLEIDING

1 — In het jaar 1889 promoveerde te Amsterdam H. P. WIJSMAN op een dissertatie, getiteld: „De diastase, beschouwd als mengsel van maltase en dextrinase”. Hierin werd op een geheel bijzondere wijze aangetoond, dat moutextract twee, onafhankelijk van elkaar bestaande amylasen bevat. De methode van WIJSMAN berust op het verschillend gedrag van de beide enzymen in zetmeelhoudende gelatine. Wanneer men in een Petrischaal een gelatineplaat giet, die behalve 8% gelatine ongeveer $\frac{1}{4}$ % oplosbaar zetmeel bevat en men brengt daarop een druppeltje moutextract, dan diffundeert van daar uit de amylase in de omringende gelatine en tast daarbij het zetmeel aan. Het fraaiste krijgt men dit verschijnsel te zien, wanneer men na een diffusie van eenige dagen de plaat met een verdunde oplossing van jodium in joodkalium overgiet. Er vertoont zich dan op een diepblauwe ondergrond een rond diffusieveld, dat uit twee deelen bestaat: een kleurloos centrum, omgeven door een paarsen ring (fig. 1a). De begrenzing van de beide gebieden is scherp, wanneer men de proef op de juiste wijze uitvoert ¹⁾.

Dit verschijnsel nu is volgens WIJSMAN als volgt te verklaren: moutextract bevat twee amylasen, die met verschillende snelheid in de gelatine diffundeeren. Het enzym, dat het snelst diffundeert, krijgt een voorsprong op het andere en de paarse ring geeft het gebied aan, waar alleen *dit* enzym op het zetmeel heeft ingewerkt. Het laat daarbij een stof achter, die met jodium een paarse reactie vertoont. Door het andere, langzamer diffundeerende enzym, wordt deze stof vervolgens afgebroken tot een product, dat zich met jodium niet meer kleurt.

1) Zie pag. 26.

Dat zich in den ring slechts één der beide enzymen bevindt, wordt aangetoond, door met een steriel mesje uit een ring, die niet met jodium behandeld is, een stukje uit te snijden en dit nu weer op een zetmeel-gelatineplaat te leggen. Er vertoont zich dan na eenige dagen en behandeling met jodium om het stukje een zuiver paars diffusieveld, zonder kleurloos centrum.

De diffusiemethode kan, onder zekere voorzorgen, gebruikt worden om aan te toonen hoe de verhouding der beide amylasen verandert onder den invloed van verschillende omstandigheden. Immers zal een vermeerdering of vermindering van het enzym, dat den paarsen ring vormt, de „maltase”, een verbreeding resp. versmalling van dien ring tengevolge hebben.

Door WIJSMAN werden nu, met behulp van zijn methode, de volgende feiten vastgesteld.

a. Verwarming van moutextract op 70° C. leidt tot het steeds smaller worden van den ring. Na een verhitting van ongeveer 10 min. vertoont het extract nog slechts een kleurloos diffusieveld (fig. 1c). Het is dus mogelijk, door verwarming op 70° de „maltase” grootendeels of misschien zelfs geheel uit het mengsel te verwijderen. Het ontbreken van den ring is echter geen zeker bewijs voor de enkelvoudigheid¹⁾ van het praeparaat. Een relatief geringe hoeveelheid „maltase” immers is wellicht niet in staat de grens van het kleurlooze diffusieveld te bereiken.

b. Onder den invloed van zwakke zuren, b.v. van melkzuur, wordt de paarse ring naar verhouding breder; daaruit blijkt, dat in zwak zuur milieu de „dextrinase” sneller geïnactiveerd wordt dan de „maltase”.

c. Wanneer men de amylase met alcohol van verschillende concentratie neerslaat, dan vertoont de met verdunden alcohol neergeslagen fractie smallere ringen dan het deel, dat pas door geconcentreerden alcohol wordt uitgevlokt; het is dus mogelijk, door gefractioneerde praecipitatie met alcohol een gedeeltelijke scheiding der beide enzymen te bewerkstelligen.

d. De belangrijkste ontdekking wellicht, die WIJSMAN met behulp van zijn methode heeft kunnen doen is de localisatie der

1) Onder de „enkelvoudigheid” van een amylasepraeparaat wordt hier en in den vervolge verstaan, dat het slechts een der beide enzymen bevat.

beide amylasen in de moutkorrel. „Maltase” en „dextrinase” worden in verschillende weefsels aangetroffen. De „maltase” ontstaat uitsluitend in het melige endosperm, de „dextrinase” in de aleuronlaag en in het cylinder-epitheel van het scutellum. De „dextrinase” treedt het eerst in de aleuronlaag op, later in de kiem; gedurende de kieming diffundeert zij naar het inwendige van de korrel en de oplossing van het zetmeel geschiedt onder den invloed der beide enzymen. Het rustende zaad bevat uitsluitend, of tenminste in hoofdzaak „maltase”. Dit feit stelde WIJSMAN in de gelegenheid om een enkelvoudig praeparaat van dit enzym te bereiden. Hij ging daarbij uit van geparelde gerst, d.w.z. van ongekiemde gerst, waarvan door een bepaalde wijze van malen de kiem en de aleuronlaag verwijderd zijn. Een dergelijk praeparaat vertoont enkel een paars diffusieveld (fig. 1b).

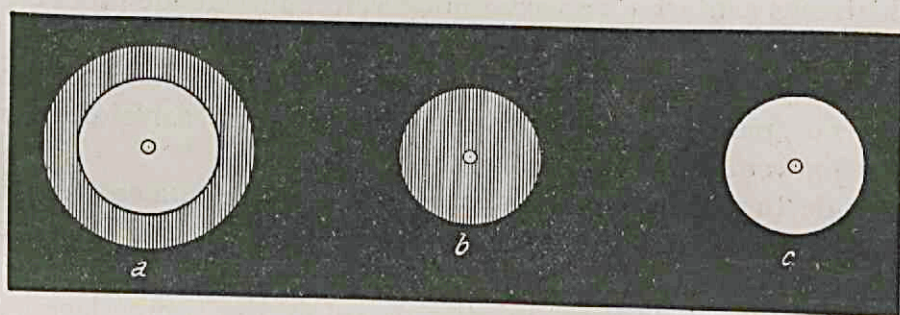
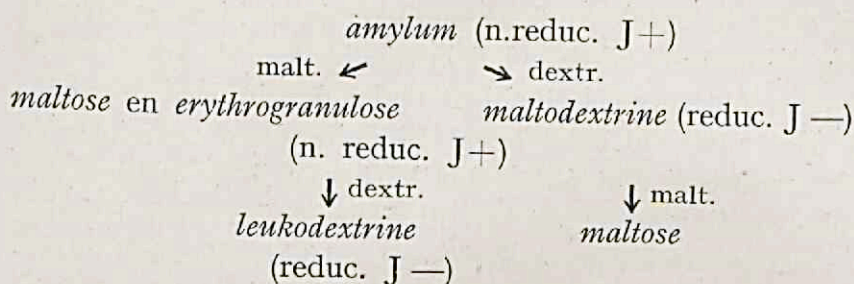


Fig. 1 — Diffusiefiguren van moutamylase in zetmeelhoudende gelatine. De ondergrond moet donkerblauw gedacht worden, het geharceerde paars. a. moutextrakt, resp. α - β -moutamylase. b. β -moutamylase („maltase”). c. α -moutamylase („dextrinase”).

Om na te gaan, bij welke onderdeelen van het omzettingsproces de maltose gevormd wordt, heeft WIJSMAN gebruik gemaakt van de door BEYERINCK ontdekte eigenschap van een lichtgevende bacterie (*Photobacterium phosphorescens*, BEYERINCK) om maltose te vergisten onder het vertoonen van een lichtverschijnsel, zetmeel en dextrine daarentegen niet. Cultiveert men nu deze bacterie op een zetmeelhoudende vischgelatine-plaat en laat men hierin moutamylase diffundeeren, dan ziet men een lichtverschijnsel op de plaats waar maltose ontstaat. Het bleek, dat dit het geval was

aan den buitenrand van den paarsen ring, niet echter aan den rand van het kleurlooze diffusieveld.

Op grond van zijn proeven kwam WIJSMAN tot het onderstaande schema voor de werking der beide enzymen.



Tusschen haakjes staat aangegeven, of de producten al dan niet een reduceerend vermogen bezitten en een reactie geven met jodium. Volgens WIJSMAN kunnen dus *beide* enzymen het zetmeel rechtstreeks aantasten onder vorming van reduceerende producten (maltose en maltodextrine). Daarbij doet echter alleen de „dextrinase” de jodiumreactie verdwijnen, terwijl aan de andere kant alleen de „maltase” tot de vorming van maltose aanleiding zou kunnen geven.

Van de tusschenproducten verdient de *erythrogranulose* vermelding. Dit product ontstaat door zetmeeloplossing zoo lang met „maltase” te bewerken tot geen verdere omzetting plaats heeft. Met alcohol kan het uit het reactiemengsel worden neergeslagen, al of niet na verwijdering van de maltose door vergisting. In beide gevallen kan het geheel vrij van maltose verkregen worden. Door „maltase” wordt het niet omgezet. Terecht noemt WIJSMAN het een „granulose” en niet een dextrine, daar het alle kenmerken van het oorspronkelijke zetmeel bevat, terwijl men onder dextrinen *afbraakproducten* verstaat, welke altijd een reduceerend vermogen bezitten.

In den loop van onze beschouwingen zal blijken, dat dit product in meer of minder zuiveren toestand onder verschillende namen een belangrijke rol heeft gespeeld bij het zetmeelonderzoek en dat ook wij er een bijzondere aandacht aan hebben moeten besteden.

Het onderzoek van WIJSMAN draagt er de sporen van, dat het uit het werk van BEYERINCK is voortgekomen; de voor de bac-

teriologie zoo vruchtbaar gebleken „auxanografische methode” is er duidelijk in te herkennen. Het is trouwens ook BEYERINCK ¹⁾ geweest, die ontdekt heeft, dat men een mengsel van twee stoffen scheiden kan door diffusie in gelatine-gel. Op een cultuurplaat van 10 % gelatine bracht hij een druppeltje ferrichloride. Er ontstond een bruin diffusieveld van ferrihydroxyde, omgeven door een ring, welke zoutzuur bevatte, waarvan de aanwezigheid bleek uit een verdieping in het oppervlak der gelatineplaat aan den buitensten rand van den ring. Een nog merkwaardiger experiment was dat, waarbij hij een mengsel van zoutzuur- en zwavelzuuroplossing liet diffundeeren. Ook hier was aan een verdieping in de gelatine te zien, hoe ver het zuur zich in de plaat had uitgebreid. Behandelde hij nu zulk een plaat met een oplossing van bariumchloride, dan ontstond alleen in het centrum een neerslag van sulfaat.

De door WIJSMAN uit het diffusiebeeld van de moutamylase getrokken conclusie wordt door deze proeven wel gerechtvaardigd. De vraag, wat er nu in de gelatineplaat precies gebeurt, is niet gemakkelijk te beantwoorden. Het verschijnsel laat zich op grond van onze tegenwoordige kennis van de structuur der gelen nog het beste beschouwen als een soort „capillair-analyse”, zooals die door GOPPELSROEDER ²⁾ met behulp van filtreerpapier is toegepast op mengsels van kleurstoffen. De beide moutamylasen zouden dan verschillend ver in de capillairen van het gel worden opgezogen. Onze ervaringen bij de uitvoering der diffusie-proeven zijn met deze voorstelling wel in overeenstemming te brengen.

Het werk van WIJSMAN, waarvan hier in het kort een overzicht gegeven werd, is door de meeste onderzoekers, die zich na 1890 met de moutamylase hebben bezig gehouden, vrijwel niet opgemerkt. Met uitzondering van een nog te bespreken publicatie van BEYERINCK vindt men nergens iets vermeld omtrent een herhaling van de diffusie-proeven of een poging, daartoe gedaan. Toch moet aan deze proeven een bijzondere beteekenis worden toegekend. Het is herhaalde malen geconstateerd, dat moutamylase na verhitting, of na het brengen op een betrekkelijk hoogen zuurgraad,

1) M. W. BEYERINCK, Zts. f. Physikal. Chem. 3, 110 (1889). Zie ook: Verzamelde Geschriften, Delft (1921), Deel II, pag. 237.

2) FR. GOPPELSROEDER Verh. d. Naturf. Gesellsch. Basel, 17 (1901).

van eigenschappen verandert; deze feiten vormen echter nog geen bewijs voor de aanwezigheid van twee enzymen. Terecht merkt KUH¹) hieromtrent het volgende op:

„Für katalytische Hydrierungen mit Platinmohr geht z.B. aus „einer Untersuchung von R. WILLSTAETTER und D. HATT hervor, „dass ein Katalysator, der zunächst auf zwei Stoffe A und B Wasserstoff zu übertragen vermag, nach gewissen Veränderungen nur „noch A hydrieren kann, während er gegenüber B vollkommen „wirkungslos geworden ist. Diese Erscheinung, dass eine Ferment- „lösung, die ursprünglich den Umsatz von zwei Stoffen katalysiert, „nach dem Erhitzen oder anderen Veränderungen nur noch eine der „beiden Wirkungen aufweist, kann somit ohne nähere Prüfung „nicht als sicherer Beweis für das Vorhandensein von zwei Fer- „menten mit verschiedener Stabilität, z.B. Amylase und Dextri- „nase, gelten”.

De diffusieproef nu is tot dusver het eenige experiment, dat ons in staat stelt om zonder dergelijke ingrijpende behandelingen, een scheiding tusschen de beide bestanddeelen der moutamylase te weeg te brengen.

In de tweede plaats hebben de snelheid en het gemak, waarmee de proef, gegeven een zekere routine, is uit te voeren en de uiterst geringe hoeveelheid enzym, welke er slechts voor noodig is, het aan WIJSMAN mogelijk gemaakt om een zoo groot gebied te bestrijken, als in geen ander onderzoek het geval is geweest. Toen de door hem in één verband waargenomen verschijnselen later afzonderlijk door verschillende onderzoekers teruggevonden werden, is deze samenhang weer verloren gegaan. De veronachtzaming van het werk van WIJSMAN, waarover BEYERINCK reeds in 1895 klaagde, heeft de ontwikkeling der enzymchemie op dit punt dus wezenlijk vertraagd.

Van minder belang moeten de proeven met lichtende bacteriën geacht worden. Zij geven ons slechts kwalitatieve resultaten, terwijl gebleken is, dat het juist de *hoeveelheid* gevormde maltose is, die ons een dieper inzicht in de werking der enzymen kan verschaffen. Daar komt dan nog bij, dat die kwalitatieve resultaten van WIJSMAN, voor zoover zij de „dextrinase” betreffen, aan twijfel onder-

1) R. KUHN, A. 443, 7-8 (1925). A = (Liebig's) Annalen der Chemie.

hevig zijn. Volgens WIJSMAN zou de „dextrinase” uit zetmeel enkel maltodextrine vormen, geen maltose. Toch heeft hij bij de werking van dit enzym een lichtverschijnsel waargenomen, dat hij echter toeschreef aan een geringe hoeveelheid „maltase”, die zich nog in zijn praeparaat zou hebben bevonden. Reeds BEYERINCK kwam, zooals wij dadelijk zullen zien, tot een andere conclusie, terwijl uit onze ervaringen volgt, dat een volgens WIJSMAN bereid praeparaat van „dextrinase” in het geheel geen „maltase” meer bevat. Het door WIJSMAN opgestelde reactieschema is dus op dit punt niet juist gebleken. Het was trouwens al onwaarschijnlijk, dat het eindresultaat van de inwerking verschillend zou zijn, al naar de *volgorde*, waarin de beide amylasen werken.

Aan de andere kant echter dient er op gewezen te worden, dat WIJSMAN de eerste en tot 1925 de eenige is geweest, die de meening heeft uitgesproken, dat *beide* amylasen in staat zijn *rechtstreeks* op het zetmeel in te werken. Het is gebleken, dat deze voorstelling als juist moet worden beschouwd in tegenstelling tot de lang gehuldigde opvatting, volgens welke het eene enzym het zetmeel zou „oplossen” tot de vorming van een dextrine, terwijl pas *daarna* het andere enzym uit dit dextrine maltose zou kunnen vormen.

2 — Van de zeer omvangrijke literatuur over de moutamylase zal hier alleen dat deel besproken worden, dat zich bezig houdt met de kwestie der beide enzymen of dat daarmee in nauw verband is gebleken te staan.

Reeds in 1890 verkrijgt het onderzoek van WIJSMAN op een enkel punt een bevestiging door het werk van BROWN en MORRIS ¹⁾ die, onbekend met WIJSMAN en onafhankelijk dus van de diffusiemethode, tot de ontdekking komen, dat het endosperm van ongekiemde gerst een weinig werkzaam enzym bevat, dat niet zetmeel-oplossend werkt, terwijl bij de kieming door het epithelium van het scutellum een ander enzym wordt afgescheiden, dat het zetmeel gemakkelijk oplost. Het eerste enzym noemen zij „translocatie-diaстase”, het tweede „secretie-diaстase”.

1) H. T. BROWN and G. H. MORRIS, J. Chem. Soc. London, **57**, 505, (1890).

In 1895 heeft BEYERINCK ¹⁾ een onderzoek gepubliceerd over het voorkomen van „glucose” (het enzym, dat wij tegenwoordig maltase noemen) in verschillende organismen; daarbij wordt echter ook veel aandacht aan de zetmeelsplitsende enzymen besteed. Het onderzoek van WIJSMAN wordt uitvoerig beschreven en een groot deel der proeven herhaald. BEYERINCK vindt, dat het enzym, dat uit het scutellum diffundeert, naast maltodextrine ook maltose vormt. Hij noemt dit enzym „granulase” en meent, dat de „dextrinase” van WIJSMAN als een daaruit door verhitting ontstaan kunstproduct moet worden beschouwd. Door de verhitting zou het suikervormend vermogen verdwenen zijn en alleen het dextrinevormende overgebleven. Het gelukte BEYERINCK echter niet de „granulase” van andere graansoorten door verhitting in „dextrinase” om te zetten. Wij hebben reeds uiteengezet, dat ook uit de proeven van WIJSMAN tot de maltosevorming van „dextrinase” moet worden besloten. Wat echter aan allen twijfel, op dit punt, een einde maakt, is het door mij geconstateerde verschijnsel, dat verhitting van de „dextrinase” *het suikervormend vermogen aanzienlijk bevordert*. „Granulase” en „dextrinase” zijn dus wel een en hetzelfde enzym.

Een geheel andere twee-enzymen-theorie ontmoeten wij in een artikel van POTTEVIN ²⁾, welke door alcohol neergeslagen amylase laat inwerken op zetmeel en verschillende, door gefractioneerde praecipitatie met alcohol van elkaar gescheiden, dextrinen. Hij komt tot de conclusie, dat de reacties *zetmeel-dextrine* en *dextrine-maltose* door verschillende enzymen worden gekatalyseerd. Het verschil met de opvatting van WIJSMAN bestaat voornamelijk hierin, dat volgens POTTEVIN slechts een der beide enzymen het zetmeel rechtstreeks zou kunnen aantasten. Deze meening heeft langen tijd voor *de* twee-enzymen-theorie van de moutamylase gegolden, latere onderzoekingen hebben de onjuistheid ervan echter duidelijk aangetoond.

In 1902 ontdekt BAKER ³⁾, onbekend met WIJSMAN, een verschil tusschen de enzymen uit gekiemde en ongekiemde gerst. Hij laat

1) M. W. BEYERINCK, Centr. f. Bact. Abt. 2, Bd. 1, 221, 265, 329 (1895). Zie ook: Verzamelde Geschriften, Delft (1921), Deel III, pag. 128.

2) H. POTTEVIN, Ann. Inst. Pasteur, 13, 665 (1899).

3) J. L. BAKER, J. Chem. Soc. London, 81, 1177 (1902).

gerstamylase werken op oplosbaar zetmeel bij 50° en vindt dan na 2 uur 60 % van de theoretisch mogelijke hoeveelheid maltose en als rest een „dextrine”, dat een blauwe kleur geeft met jodium en zwak reduceert. Na lange inwerking werd de jodiumreactie violet. Hij noemt dit restproduct, dat met alcohol uit het reactiemengsel kan worden neergeslagen α -amylodextrine. Het is een wit poeder, moeilijk oplosbaar in koud, beter in kokend water, dat een specifieke rotatie vertoont van + 190—195°. Door moutamylase wordt het omgezet onder verdwijning van de J-reactie. Klaarblijkelijk hebben wij hier dus met hetzelfde product te doen als de „erythrogranulose” van WIJSMAN. De zwakke eigenreductie zal wel het gevolg geweest zijn van een geringe omzetting door de „dextrinase”, welke zich bijna altijd in geringe hoeveelheid in de ongekiemde gerst bevindt.

Bij dit werk van BAKER sluiten zich nu, behalve latere onderzoeken van BAKER zelf, die van LING en SJOEBERG aan. Terwille van de overzichtelijkheid zullen deze publicaties hier bij elkaar behandeld worden, al moet de chronologische volgorde daardoor worden onderbroken.

BAKER en HULTON ¹⁾ onderzoeken de amylase uit ongekiemde rogge en haver. In beide gevallen vinden zij een verdergaande suikervorming dan bij ongekiemde gerst. Met rogge ging de reactie tot 72 %, echter trad bij 60 % een sterke remming op. Met ongekiemde haver werd zelfs een suikervorming tot 96 % bereikt, hier was een remming bij 60 % niet meer te onderscheiden. Als substraat gebruikten zij oplosbaar zetmeel volgens LINTNER.

Het onderzoek van LING en NANJI ²⁾ is vooral van beteekenis voor de chemie van het zetmeel. Zij zijn van meening, dat zetmeel uit twee chemisch verschillende componenten bestaat, „amylose” en „amylopektine” ³⁾ en dat men deze componenten kan scheiden met behulp van amylase uit ongekiemde gerst. Gerstamylase, gedroogd met geconcentr. alcohol doet de „amylose” quantitatief in maltose overgaan, terwijl de „amylopektine” nauwelijks wordt aangetast. Gerst-extract, zonder droging met alcohol tast de

1) J. L. BAKER and H. F. E. HULTON, J. Chem. Soc. London, **119**, 805 (1921); **132**, 1655 (1929).

2) A. R. LING and D. R. NANJI, J. Chem. Soc. London, **123**, 2666 (1923).

3) Zie Hoofdstuk VII.

„amylopektine” wel aan en vormt er een product uit, dat zij gepolymeriseerd” α - β -hexa-amylose” noemen. Deze stof vertoont nagenoeg dezelfde eigenschappen als de α -amylodextrine van BAKER en de erythrogranulose van WIJSMAN, LING en NANJI komen tot de conclusie, dat „amylose” en „amylopektine” zich in het aardappelmeel bevinden in de verhouding 2 : 1 of in procenten 66,6 %—33,3 %. BAKER en HULTON (1929) oefenen kritiek uit op deze meening naar aanleiding van hun proeven met ongekiemde haver, welke 96 % maltose vormde. Niet een van deze onderzoekers echter is bekend met WIJSMAN en heeft geweten, *dat het gebruik van ongekiemde granen volstrekt geen waarborg is voor het werken met een enkelvoudig enzym*. Niet zonder reden is WIJSMAN van geparelde gerst uitgegaan!

Een derde onderzoeker, die van de tegenstelling gerstamylase: moutamylase uitgaat, is SJOEBERG ¹⁾. Ook hij vindt, dat oplosbaar zetmeel door amylase uit ongekiemde gerst voor 59—61 % in maltose wordt omgezet. Dat dit werkelijk een afbraak-grens is en geen evenwicht, toont hij aan, door tijdens de omzetting te dialyseren. Daardoor wordt de maltose verwijderd, de vloeistof binnen de membraan geeft na afloop van de omzetting echter nog een zuiver blauwe jodiumreactie. „Die Enzymlösung verhält sich also „nicht wie diejenige, welche man gewöhnlich durch Extraktion von „Malz bekommt, sondern sie scheint einen Teil der enzymatischen „Tätigkeit nicht zu haben”. SJOEBERG en ERIKSSON vinden dan, dat er twee enzymen moeten worden onderscheiden, waarvan het eene maltose vormt, terwijl het andere de jodiumreactie doet verdwijnen. Er is echter niet alleen verschil in „zetmeelsplitsende” en „suikervormende” werking, maar ook de afkomst der praeparaten doet er toe. Zij hebben ook gewerkt met „amylose” en „amylopektine”, dat zij bereiden volgens GATIN-GRUSZEWSKA ²⁾ en vinden, in tegenstelling met LING en NANJI, dat „amylose” niet volledig wordt omgezet door gerstamylase. Eenig wezenlijk verschil tusschen de beide „componenten” van het zetmeel vinden zij ook niet.

Wij komen in het hoofdstuk over zetmeel en glycogeen op deze

1) K. SJÖBERG, H. **131**, 116 (1923); K. SJÖBERG und E. ERIKSSON, H. **139**, 118 (1924). (H = HOPPE-SEYLER's Zeitschr. f. Physiol. Chemie).

2) Z. GATIN-GRUSZEWSKA, C. r. Ac. Sc. **146**, 540 (1908).

onderzoekingen terug en zullen daar zien, dat door verschillende onderzoekers onder „amylopektine” zeer verschillende stoffen zijn verstaan.

Keeren wij nu weer tot de oudere publicaties terug, dan vinden wij allereerst een mededeeling van FRAENKEL en HAMBURG ¹⁾, welke vermelding verdient. Het schijnt hen namelijk gelukt te zijn, bij dialyseeren van een oplossing van moutamylase tegen steriel water, een scheiding te krijgen tusschen de beide enzymen. In het water gaat in hoofdzaak de „versuikerende” werking, terwijl de „zetmeeloplossende” binnen de membraan blijft. Het suikervormend enzym (de „maltase”) vertoont dus ook blijkens deze proeven de grootste beweeglijkheid of de geringste neiging om geadsorbeerd te worden.

CHRZASZCZ ²⁾ heeft de beide werkingen gescheiden door gefractioneerde praecipitatie van moutextract met ammoniumsulfaat. In de eerste fractie gaat meer de „zetmeeloplossende” werking, in de middelste en hoogste meer de „suikervormende”. Dit komt dus volkomen overeen met wat door WIJSMAN gevonden is bij de gefractioneerde praecipitatie met alcohol.

SHERMAN en SCHLESINGER ³⁾, die zeer actieve praeparaten hebben gemaakt door praecipitatie van gedialyseerd moutextract met alcohol of aceton, onderscheiden twee werkingen of „krachten” in de amylase, de „zetmeeloplossende” (amyloclastic power) en de „suikervormende” (saccharogenic power) en schrijven die toe aan de aanwezigheid van twee enzymen, waarvan het eene het zetmeel afbreken zou tot dextrine, het andere de dextrine tot maltose. Een opvatting dus, welke met die der Fransche onderzoekers (POTTEVIN), niet met WIJSMAN, in overeenstemming is. De werking van het „zetmeeloplossend” enzym wordt gemeten met de jodiummethode, waarbij wordt nagegaan, hoeveel enzym in 30 min. bij 40° C. de jodiumreactie geheel doet verdwijnen; die van het „suikervormend” enzym door bepaling van het reduceerend vermogen van het reactiemengsel, 30 min. na het begin van de reactie. Zij komen tot de conclusie, dat er geen quantitatief verband is tusschen de

1) S. FRAENKEL und M. HAMBURG, Beitr. Chem. Physiol. u. Path. 8, 389 (1906).

2) T. CHRZASZCZ, Woch. f. Br. 28, 510 (1911).

3) H. C. SHERMAN and M. D. SCHLESINGER, J. Am. Chem. Soc. 35, 1617, 1784, (1913).

zetmeelsplitsing en de suikervorming; het verdwijnen van de jodiumreactie is geen maat voor de hydrolyse van het zetmeel (*amylum solubile* volgens LINTNER).

Hierbij kan worden opgemerkt, dat het resultaat van dit onderzoek *schijnbaar* in overeenstemming is met de theorie. Het is later gebleken, dat *beide* enzymen suiker vormen (zooals WIJSMAN trouwens al vermeldt), terwijl echter slechts bij de werking van het ééne de jodiumreactie verdwijnt. Het spreekt wel vanzelf, dat men deze verschijnselen niet kan onderscheiden, zoolang men met een *mengsel* der beide enzymen werkt. Eenige latere onderzoeken van SHERMAN zullen elders besproken worden.

De opleving der enzymchemie na 1920 onder invloed van de door WILLSTAETTER ¹⁾ ingevoerde methode der selectieve adsorptie, doet zich ook gelden op het gebied der moutamylase. Dit enzym schijnt zich echter voor de genoemde methode slecht te leenen, de meeste onderzoekers werken met, al dan niet door dialyse gezuiverd, moutextract.

HIZUME ²⁾ doet vergelijkende proeven tusschen de „oplossende” werking op zetmeelstijfelpap en de „suikervorming” van moutextract (zonder verdere zuivering). Hij acht het resultaat van FRAENKEL en HAMBURG niet juist, omdat zij slechts een gedeeltelijke scheiding tusschen de beide werkingen konden verkrijgen. Bij activeerings-proeven met verschillende zouten vindt hij een volledig parallelisme tusschen de „suikervormende” en de „zetmeeloplossende” kracht.

Wij komen dan tot een publicatie van SYNIEWSKI ³⁾, de eenige, die meer dan een oppervlakkige beschouwing wijdt aan het werk van WIJSMAN. De meeste onderzoekers nemen aan, dat er naast een zetmeeloplossend-dextrinevormend enzym een dextrineafbrekend-suikervormend bestaat. Dit is geen ware twee-amylasen-theorie, want alleen het eerstgenoemde enzym zou met recht een amylase mogen heeten. Een ware twee-amylasen-theorie vinden we bij WIJSMAN. WIJSMAN had echter weinig succes door zwakke be-

1) R. WILLSTÄTTER, Ber. Chem. Ges. **55**, 3601 (1922), zie ook M. GRASSMANN, Neue Methoden und Ergebnisse der Enzymforschung, München (1928).

2) K. HIZUME, Bioch. Zts. **146**, 52 (1924).

3) V. SYNIEWSKI, Biochem. Zts, **158**, 87; **162**, 228 (1925).

wijsvoering en door de onwaarschijnlijkheid van zijn reactieschema. SYNIEWSKI neemt met WIJSMAN aan, dat er twee enzymen zijn, die allebei maltose vormen. Het enzym uit de ongekiemde gerst noemt hij „ α -diastase”, bij de werking daarvan op amyllum solubile blijft een niet-reduceerend „grensdextrine” over, dat zich met jodium blauw kleurt. Eerst door het mouten ontstaat „ β -diastase”, deze is te krijgen door verhitting van moutextract op 60—70°, en levert een reduceerend grensdextrine. Gewerkt werd met gerst- en moutextracten.

Wij hebben reeds vermeld, dat het onjuist is, een niet reduceerend product een dextrine te noemen. Verder is het wel merkwaardig, dat SYNIEWSKI niets mededeelt omtrent een herhaling van de diffusieproeven, die toch de kern van WIJSMAN's onderzoek uitmaken en dat hij zonder nadere contrôle aanneemt, dat ongekiemde (niet geparelde) gerst een volkomen enkelvoudig enzympraeparaat oplevert. Bovendien vermeldt hij bij zijn activiteitsbepalingen niets omtrent den zuurgraad, waarbij zij geschieden. Heel veel wijzer worden we dus niet door SYNIEWSKI.

Hetzelfde kan niet gezegd worden van het werk van OHLSSON ¹⁾, dat als een der belangrijkste onderzoeken van den laatsten tijd moet worden beschouwd. Uitgaande van een publicatie van BOURQUELOT (1887), heeft hij het gedrag van moutextract bij verschillende temperaturen en zuurgraden aan een zeer nauwkeurig onderzoek onderworpen. De activiteit van het dextrinevormende enzym, door hem „dextrinogeen-amylase” genoemd, werd bepaald met de jodiummethode van WOHLGEMUTH ²⁾, die van het suikervormende enzym, de „saccharogeen-amylase”, met de methode der quantitative suikerbepaling volgens BANG ³⁾. De enzymen vertoonen een zoodanig verschillende gevoeligheid voor verhooging van temperatuur of zuurgraad, dat een *scheiding* mogelijk is. Brengt men moutextract bij 0° gedurende 15 min. op pH 3,3 en voegt men daarna sec. Na-phosphaat toe tot pH 6,0, dan is nog 70—80 % van de oorspronkelijke „suikervorming” over, tegen slechts 1—2 % van de „dextrinevorming”. Verhit men daarentegen het extract

1) ERIK OHLSSON, C. r. du Lab. Carlsberg, Vol. 16, Nr. 7, p. 1 (1926).

2) J. WOHLGEMUTH, Biochem. Zts, 9, 1 (1908).

3) I. BANG, Biochem. Zts, 32, 417 (1911).

gedurende 15 min. op 70° C. dan is van de „dextrineerende” werking nog 75 % over, terwijl de „suikervorming” zeer gering geworden is. Geheel verdwijnen doet zij echter niet, ook niet bij voortgezette verhitting. Van deze beide praeparaten heeft OHLSSON vervolgens de pH-kromme bepaald. De werking van de „saccharogeenamylase” is optimaal bij ca. pH 4,9 met een langzame daling naar de alkalische zijde, de „dextrinogeen-amylase” vertoont haar hoogste werking bij pH 5,75 met een veel steiler verloop van de kromme. Hier hebben wij dus een nieuw en zeer belangrijk argument voor de twee-enzymen-theorie. Bovendien blijkt uit dit onderzoek, dat beide enzymen rechtstreeks op het zetmeel vermogen te werken en dat ook de „dextrinogeen-amylase” in staat is suiker te vormen, zij het in geringere hoeveelheid dan de „saccharogeen-amylase”. Toch zijn er nog wel eenige bezwaren tegen het werk in te brengen. Om te beginnen wijkt de „saccharogeen-amylase” hierin af van de „maltase” van WIJSMAN, dat zij op den duur de jodiumreactie doet verdwijnen; wellicht is zij dus niet geheel enkelvoudig. Verder kan het feit, dat gewerkt werd met ongedialyseerd moutextract, dat altijd een meer of minder groote hoeveelheid suikers bevat, op het gedrag der enzymen van invloed zijn geweest. Wel heeft OHLSSON telkens blanco-bepalingen gedaan, maar de reeds bij voorbaat aanwezige maltose in het reactiemengsel zal stellig remmend gewerkt hebben op de suikervorming, wat vooral bij de „dextrinogeen-amylase” van beteekenis kan zijn geweest ¹⁾.

Een tegenstander van de twee-enzymen-theorie vinden we in NISHIMURA ²⁾. Terwijl OHLSSON met oplosbaar zetmeel werkte, doet NISHIMURA zijn proeven met gewoon aardappelmeel en bepaalt het „oplossend” vermogen van zijn amylase-paeparaat (moutextract) door meting van de viscositeit. Bij verwarming van het enzym neemt de „versuikering” sneller af dan de „oplossing”, de beide werkingen zijn echter niet te splitsen. Verschuift men den zuurgraad, waarbij de reactie verloopt, van pH 6,0 naar pH 3,0 dan wordt daarentegen de „oplossende” kracht sterk geremd, de „suikervormende” weinig. Zooals men ziet dezelfde feiten, die OHLSSON geconstateerd heeft. Dat de beide „werkingen” niet te splitsen zijn,

1) Zie voor verdere beschouwingen over dit werk Hoofdstuk III.

2) S. NISHIMURA, Biochem. Zts, 200, 81 (1928).

ligt in den aard van het „oplossend” enzym, dat *tevens* versuikerend werkt. NISHIMURA komt tot de slotsom, dat er niet twee enzymen zijn, maar één, met een „activator”. De „activator” wordt bij pH 3 geïnactiveerd, bij pH 7,4 is hij weer actief. Bij 70° wordt het eigenlijke enzym sterk beschadigd, de „activator” blijft intact.

Het ligt echter in het begrip „activator”, dat een dusgenaamde stof *op zichzelf* geen enzymatische werking uitoefent. Nemen wij dit in acht, dan komt de voorstelling van NISHIMURA op hetzelfde neer als die van OHLSSON.

Een andere en zeer heftige tegenstander van de twee-enzymen-theorie is SABALITSCHKA ¹⁾. Ook hij werkt met moutextract en drukt zoowel de „dextrineerende” werking als de „versuikerende” uit in den vorm van reactiesnelheidskonstanten k_z en k_d , waartoe hij niet alleen let op het verdwijnen van de jodiumreactie, maar ook op een aantal tusschentinten, die hij reproduceert met behulp van organische kleurstoffen. Het quotient $k_z : k_d$ vindt hij nagenoeg gelijk aan 1. Na adsorptie van de amylase aan kaoline bij pH 4,4 en elutie bij pH 7,6 is de werkzaamheid 15—17 maal zoo groot als die van het oorspronkelijke moutextract, zonder dat het quotient $k_z : k_d$ veranderd is. Dit pleit dus volgens SABALITSCHKA voor de eenheid der beide werkingen. Een voorbehandeling van het extract bij pH 7,8—8,4 doet dit quotient evenmin veranderen. Alleen in „geheel bijzondere gevallen” is de k van de monomoleculaire reactie niet konstant en krijgt ook het quotient een hogere waarde (tot 1180 toe). Dit gebeurt bij moutextracten, die aan een zuurgraad hooger dan pH 4,0 blootgesteld waren, bij door ouderdom verzuurde praeparaten en bij verse extracten van *ongekiemde gerst*. Hier wordt slechts 60 % van de theoretische mogelijke hoeveelheid maltose gevormd, terwijl de jodiumreactie pas tegen het eind der suikervorming een kleuromslag vertoont. Het „dextrineeringsvermogen” is hier volgens S. echter slechts schijnbaar sterker verminderd, dan de suikervorming. „Solange die Verzuckerungskinetik den von uns als „normal” angenommenen Typ zeigt, liegt auch der „Quotient $k_z : k_d$ stets nahe am 1”.

Het zal duidelijk zijn, dat de redeneering van SABALITSCHKA berust op een willekeurig gebruik van het begrip „normaal”. Voor

1) TH. SABALITSCHKA, Biochem. Zts, 207, 476; 215, 267; 211, 229 (1929).

het overige zijn ook hier de meeste feiten weer dezelfde als die door andere onderzoekers geconstateerd werden. Wat de adsorptieproeven betreft, deze zouden onder veel meer gevarieerde omstandigheden uitgevoerd moeten zijn, om iets te kunnen bewijzen.

Wij komen nu tot de bespreking van enkele publicaties, die wel niet rechtstreeks betrekking hebben op het twee-enzymen-probleem, maar die daarmee toch in nauw verband zijn gebleken te staan. De oudste betreft een onderzoek van Mlle. PHILOCHE ¹⁾ waaruit wij alleen dat deel zullen lichten, dat voor ons van belang is. Mlle. PHILOCHE vergelijkt de hydrolyse van oplosbaar zetmeel en glycogeen door moutamylase en pankreas-amylase. Een bepaalde hoeveelheid moutamylase geeft met glycogeen een veel geringer maltose-vorming, dan met een zelfde hoeveelheid zetmeel onder gelijke omstandigheden. Om gelijke hoeveelheden maltose te krijgen, was met glycogeen 20—100 maal zooveel amylase nodig, als met zetmeel. Bij pankreas-amylase doet zich dit verschil niet voor. Beide enzymen werken in nagenoeg dezelfde mate op zetmeel, met glycogeen daarentegen vertoont pankreas-sap een veel sterkere werking dan moutextract. De schrijfster geeft in de volgende bewoordingen een mogelijke verklaring van dit verschijnsel: „Ce résultat est intéressant puisqu'il démontre l'existence d'une „adaptation de l'amylase animale vis-à-vis du glycogène, produit „qu'elle hydrolyse habituellement, tandis que l'amylase végétale „du malt, ne rencontrant jamais de glycogène au cours de la vie „de la plante, n'est pas adaptée à l'hydrolyser”.

„Nous semblons donc retrouver dans les amylases elles-mêmes une „sorte de spécificité” (curs. van mij).

Deze veronderstelling van een verschillende specificiteit van moutamylase en pankreas-amylase op grond van de verschillende stoffen, welke zij *hydrolyseeren*, vindt nu een merkwaardige bevestiging in een onderzoek van RICHARD KUHN ²⁾ betreffende de verschillende producten, die door de genoemde enzymen *gevormd* worden bij de hydrolyse van oplosbaar zetmeel. Uitgaande van een ontdekking van BROWN en MORRIS ³⁾ bestudeert KUHN de rotatie

1) CH. PHILOCHE, Journ. de Chim. Phys. **6**, 355, 394 (1908).

2) RICHARD KUHN, Ber. Chem. Ges. **57**, 1965 (1924); A. **443**, 1 (1925).

3) H. T. BROWN and G. H. MORRIS, J. Chem. Soc. London, **67**, 309 (1895).

van de bij de reactie gevormde maltose. Maltose bestaat, evenals de monosacchariden in twee vormen, die een verschillend draaiingsvermogen bezitten, α -maltose en β -maltose, die in oplossing in elkaar overgaan tot een evenwichtstoestand bereikt is. KUHN laat nu verschillende amylasen bij matige temperatuur (20° C.) snel reageeren met een zeer heldere, door electro-dialyse gezuiverde zetmeeloplossing en bepaalt dan de verandering van het draaiingsvermogen van het reactieproduct, voor en na de toevoeging van een weinig Na-carbonaat. Door alkali wordt de omzetting der beide maltose-vormen in elkaar n.l. zeer versneld.

Hij vindt dan, dat pankreas-amylase en „Takadiastase” (*Aspergillus-amylase*) een maltose vormen, waarvan het draaiingsvermogen *daalt* na toevoeging van alkali, terwijl het product van de moutamylase (gedialyseerd moutextract) een *stijging* vertoont. Deze verschijnselen kunnen verklaard worden, door aan te nemen, dat bij de werking van pankreas-amylase en *Aspergillus-amylase* in eerste instantie α -maltose ontstaat, welke dan onder den invloed van alkali overgaat in α - β -maltose, terwijl moutamylase tot het ontstaan van β -maltose aanleiding geeft, dat dan eveneens in α - β -maltose overgaat. Op grond hiervan onderscheidt KUHN α -amylasen en β -amylasen. Het blijkt dus, dat pankreas-amylase en moutamylase ook wat hun *reactieproducten* betreft, een verschillende specificiteit bezitten. Bovendien gedragen zij zich nog in een ander opzicht verschillend. Bij de werking van moutamylase op oplosbaar zetmeel is de jodiumreactie nog blauw, wanneer reeds 60 % maltose gevormd is, bij 80 % is zij onder omstandigheden nog bruin. Daarentegen verdwijnt met pankreasamylase de jodiumreactie al bij 30—35 % maltose. Dit verschil kan volgens KUHN niet verklaard worden door een depolymeriseerend (amyloclastisch) enzym naast een versuikerend aan te nemen; het onderscheid ligt in een *verschillend verloop der beide hydrolysen*. Wij zullen nog wel in de gelegenheid zijn op het werk van KUHN en PHILOCHE terug te komen. Hier zij tenslotte nog iets vermeld omtrent het jongste onderzoek van OHLSSON ¹⁾, dat bij KUHN aansluit.

Nadat OHLSSON heeft opgemerkt, dat het gedrag van de „dextrinogeen-amylase” zeer veel gelijkt op dat van pankreas- en *Asper-*

1) ERIK OHLSSON, H. 189, 17 (1930).

gillus-amylase, gaat hij de mutarotatie van de reactieproducten der beide moutamylasen aan een nauwkeurig onderzoek onderwerpen. Het blijkt, dat de „dextrinogeen-amylase” een neerwaarts roterende maltose vormt, dus tot de α -amylasen behoort; terwijl de „saccharogeen-amylase”, blijkens de opwaartsche mutarotatie van de door haar gevormde maltose, tot de β -amylasen gerekend worden moet. Daarmee is dus *de verschillende specificiteit der beide moutamylasen aangetoond*.

Het is mij gelukt langs een anderen weg een bevestiging van dit resultaat te verkrijgen en ook het verband te vinden tusschen de uitkomsten van KUHN en OHLSSON eenerzijds en die van PHILOCHE anderzijds.

Beschouwen wij nu de hier besproken publicaties in het licht van het werk van WIJSMAN, dan zien wij dat dit, juist door zijn veelomvattendheid, in staat is een verband te leggen, dat aan alle onderzoekers ontgaan is, n.l. dat tusschen *de amylase uit ongekiemde gerst* en het zgn. „suikervormende” bestanddeel der moutamylase. Het zal duidelijk zijn, dat de „translocatie-diaстase” van BROWN en MORRIS, de „gerstamylase” van BAKER, LING en SJOEBERG en de „saccharogeen-amylase” van OHLSSON *in hoofdzaak* identiek zijn met de „maltase” van WIJSMAN. Hetzelfde geldt voor de „secretie-diaстase”, de „dextrinogeen-amylase”, het „zetmeeloplossend enzym” en de „dextrinase”.

Het probleem der moutamylase verliest daarmee reeds een goed deel van zijn gecompliceerdheid.

3 — Ons onderzoek nu had in de eerste plaats tot doel, de belangrijkste diffusie-proeven van WIJSMAN te herhalen en op grond van zijn voorschriften droge praeparaten van de beide amylasen te vervaardigen. Met deze praeparaten konden dan de resultaten van OHLSSON aan een contrôle worden onderworpen. Bovendien was het noodzakelijk, de enkelvoudigheid der praeparaten op een meer overtuigende wijze, dan door OHLSSON gedaan was, aan te toonen, wat vooral bereikt zou kunnen worden door beide enzymen volgens de zelfde methode, die der quantitative maltosebepaling, te bestudeeren.

Een bijzondere moeilijkheid bij het onderzoek der amylasen wordt opgeleverd door de substraten, zetmeel en glycogeen. Deels omdat

deze stoffen in water slechts een kolloide oplossing geven, een oplossing dus, waarvan de eigenschappen niet alleen door de concentratie worden bepaald en deels ook door onze onvolkomen kennis van hun chemische structuur.

Door de meeste zetmeelchemici wordt aangenomen, dat het zetmeel uit twee componenten bestaat, „amylose” en „amylopektine”. Omtrent de vraag of wij hier te maken hebben met verschillende kolloide toestanden — sol en gel —, dan wel met stoffen van verschillende chemische structuur, lopen de meeningen uiteen. Naast deze componenten of vermeende componenten wordt veel gebruik gemaakt van zgn. „oplosbaar zetmeel”, meestal bereid volgens LINTNER ¹⁾. Op grond van overwegingen, die in het laatste hoofdstuk gegeven zullen worden, besloot ik enkel „oplosbaar zetmeel” te gebruiken.

Het is gebleken, dat zoowel van de diffusieproeven van WIJSMAN, als van de resultaten van OHLSSON een goede bevestiging verkregen kon worden en dat de volgens WIJSMAN bereide praeparaten als volkomen enkelvoudig mochten worden beschouwd. Het verloop van de werking der beide amylasen bracht mij verder tot de overtuiging, dat zich in de zetmeeloplossing twee componenten van verschillende chemische structuur moesten bevinden, een conclusie die, in verband gebracht met de onderzoeken van KUHN en PHILLOCHE tot enkele proeven met glycogeen als substraat leidden, waaruit volgde, dat een van de beide zetmeelcomponenten waarschijnlijk identiek is met glycogeen. Een en ander maakte het gewenscht om aan de beschrijving van de proeven, zooals die gegeven zal worden in de hoofdstukken II t/m VI, een korte beschouwing over den huidige stand van het zetmeelonderzoek toe te voegen.

1) l. c. pag. 25.

II

BEREIDING DER AMYLASE EN ZETMEEL- PRAEPARATEN

1 — *Nomenclatuur der beide enzymen*

De willekeur die er een tijd geheerscht heeft bij de naamgeving der enzymen, heeft tengevolge gehad, dat voor verscheidene enzymen meer dan een naam in omloop is of geweest is. Tegenwoordig huldigt men den regel, dat men het enzym noemt naar zijn substraat, dwz. naar de stof, wier omzetting hij katalyseert, gevolgd door den uitgang 'ase. De enzymen, die de hydrolyse van het zetmeel katalyseren, of meer precies van het *amylum*, dat zich in de zetmeelpreparaten bevindt ¹⁾, heeten dus *amylasen*. Een oudere benaming is *diastase*. In het fransch verstaat men onder „diastases” ook andere dan zetmeelsplitsende enzymen. Wij zullen ons aan de moderne terminologie houden.

De door WIJSMAN voor de beide componenten der moutamylase gebruikte namen „maltase” en „dextrinase” hebben betrekking op de bij de reactie *gevormde* producten. Het enzym, dat de hydrolyse van maltose tot glucose katalyseert, heette toen „glucose”, later werd dit echter eveneens „maltase” genoemd, wat tot misverstand aanleiding geven kon, te meer, daar moutextract ook „maltase” in den hedendaagschen zin des woords bevat. Een voorstel van WENT ²⁾, om dit enzym „malto-glucose” te noemen heeft geen ingang gevonden. OHLSSON ³⁾ tracht aan de moeilijkheden tegemoet

1) Dit voorbehoud is noodzakelijk, daar verscheidene zetmeelsoorten nog een ander polysaccharide schijnen te bevatten, *hemicellulose*, dat alleen door een bijzonder enzym, de *hemicellulase* wordt aangetast. Aardappelmeel bevat geen hemicellulose.

2) F. A. F. C. WENT, Jahrb. wiss. Bot. 36, 618 (1901).

3) l. c. pag. 13.

te komen door te spreken van „saccharogeen-amylase” en „dextrinogeen-amylase”. Deze namen hebben, buiten hun lengte, het bezwaar, dat zij het gedrag der beide enzymen niet juist weergeven. De „dextrinogeen-amylase” dankt haar naam daaraan, dat zij aanleiding geeft tot een snelle verdwijning van de jodiumreactie, gepaard gaande met een geringe suikervorming. Het is echter gebleken in den loop van ons onderzoek, dat dit enzym, wanneer het maar in voldoende hoeveelheid aanwezig is, aanleiding tot een zeer snelle en aanzienlijke suikervorming geven kan, waarbij een percentage aan maltose kan worden verkregen, dat met de „saccharogeen-amylase” niet te bereiken is. Het zou dus evengoed den naam „suikervormend-enzym” verdienen.

Het is het onderzoek van KUH¹⁾, dat ons in de gelegenheid stelt een eenvoudige en doeltreffende benaming voor de beide componenten in te voeren. Wanneer, zooals uit het jongste werk van OHLSSON en ook uit ons onderzoek ²⁾ blijkt, de eene component tot de α -amylasen, de andere tot de β -amylasen gerekend moet worden, dan ligt het voor de hand van α -moutamylase en β -moutamylase te spreken, waarbij dan de α -moutamylase overeenkomt met de „dextrinase”, de β -moutamylase met de „maltase” van WIJSMAN. In het vervolg zullen deze namen steeds worden gebruikt.

2 — *Bereiding van α -moutamylase en α - β -moutamylase*

WIJSMAN heeft de beide enzymen in den vorm van droge praeparaten in handen gehad. Door nagenoeg alle onderzoekers na hem, met uitzondering van SHERMAN, is met extracten gewerkt. Extracten bieden het voordeel van snel en gemakkelijk te bereiden te zijn, zij dienen echter, ter verwijdering van minerale bestanddeelen en reduceerende suikers gedialyseerd te worden, waarbij dikwijls een deel van het enzym verloren schijnt te gaan. Droge praeparaten zijn langer houdbaar, wat een groot voordeel is, daar verschillende extracten, ook wanneer zij oogenshijnlijk op dezelfde wijze bereid worden, nooit in alle opzichten met elkaar overeenkomen. Een droog praeparaat vergemakkelijkt ook de doseering van het enzym, daar een extract wel verdund, maar niet op een eenvoudige wijze geconcentreerd kan worden.

1) l. c. pag. 16.

2) Zie Hoofdstuk IV.

In het geheel werden drie praeparaten gemaakt en wel een van α -moutamylase, een van β -moutamylase en een van α - β -moutamylase, het natuurlijke mengsel der beide enzymen.

Voor de bereiding van α -moutamylase en α - β -moutamylase werd uitgegaan van zgn. „helles Malz”, afkomstig van de N.V. Exportmouterij „Nederland” te Wageningen. Door WIJSMAN was het moutextract met alcohol in vijf fracties neergeslagen, waarvan echter alleen de eerste en de laatste voor de proeven werden gebruikt. Ik besloot daarom, de amylase in twee fracties neer te slaan, een tot 60 % alcohol en een van 60—80 %. De extractie van het moutmeel en de droging der praeparaten geschieden volgens SHERMAN en SCHLESINGER ¹⁾.

Het mout werd in een handmolen zoo fijn mogelijk gemalen en bij porties van 500 gram verwerkt. Deze werden gedurende 2—3 uur bij 10—15° C. en onder voortdurend krachtig roeren geëxtraheerd met 1½ L. water, dat per L. ½ gr. KH_2PO_4 bevatte. Na afloop werd de massa door een kaasdoek geperst en de zeer troebele vloeistof aan de waterstraal-luchtpomp gefiltreerd door gehard filtreerpapier (Schleicher en Schüll Nr. 575, dat bij alle hier beschreven filtraties gebruikt werd). Om een volkomen heldere vloeistof te krijgen was het noodig, tweemaal te filtreren, de tweede maal door een filter, dat met een zeer dun laagje talcum bedekt was.

Bij de verkregen vloeistof werd nu gekoelde aethylalcohol van 96 % gevoegd, tot de concentratie van het mengsel 60 % bedroeg. Dit geschiedde in hooge cylindrische maatglazen van 1 L. Na verloop van eenige uren had het ontstane neerslag zich onder in het maatglas opgehoopt, waarna de bovenstaande vloeistof voorzichtig afgeheveld werd. De rest werd aan de waterstraalluchtpomp gefiltreerd en wel door een groote Büchner-trechter, aangezien kleine filters spoedig geheel verstopt raakten. Bovendien bleek het gewenscht om niet de volle zuigkracht van de pomp te gebruiken. Zoodra de vloeistof door het filter heengezogen was, werd dit met het daarop klevende neerslag uit den trechter verwijderd, het neerslag met een spateltje van het filtreerpapier afgelicht, op een glazen schaalte gebracht en dadelijk gedroogd in een vacuum-exsiccator boven geconcentreerd zwavelzuur. Laat men het op het filter

1) l. c. pag. 11.

drogen, dan hecht het zich daarop zoo vast, dat het er niet meer van te verwijderen is zonder meenemen van papirvezels. Den volgenden dag konden de hoornachtig uitziende stukjes in een mortier gepoederd worden. De opbrengsten der verschillende porties werden tenslotte samengevoegd en goed gemengd. Deze *eerste fractie*, waarvan ca. 12 gr. verkregen werd uit 4 KG. moutmeel, vertoonde bij diffusie in zetmeelhoudende gelatine slechts een zeer smalle ring. Zij diende daarom voor de bereiding van α -moutamylase. Dit geschiedde als volgt: het poeder werd in een mortier met water aangewreven om het te bevochtigen, vervolgens in een kolf met 300 ccm. gedest. water van ca. 60° gebracht. Een deel ging daarbij niet meer in oplossing. Zonder dat gefiltreerd was, werd nu de kolf in een op 70° gehouden waterbad geplaatst en nadat de inhoud, onder voortdurend omroeren, op temperatuur gekomen was, wat ongeveer 8 min. duurde, nog 15 min. daarin gelaten, vervolgens snel afgekoeld, gefiltreerd en uit het filtraat de α -moutamylase op de beschreven wijze met alcohol tot 60 % neergeslagen, gefiltreerd en gedroogd. Opbrengst: 2 gr. van een licht bruin gekleurd poeder, dat een volkomen kleurloos diffusieveld geeft en bij oplossing in water slechts een geringe rest achterlaat.

Bij het filtraat van de eerste fractie werd opnieuw alcohol gevoegd tot een concentratie van 80 %. Het daarbij gevormde neerslag zette zich spoediger af en was ook gemakkelijker te filtreren dan dat van de eerste fractie. De behandeling geschiedde overigens op geheel dezelfde wijze. De opbrengst bedroeg ca. 20 gr. Ter verdere zuivering werd deze *tweede fractie* nog eens opgelost in gedest. water en met alcohol neergeslagen. Een deel der begeleidende eiwitten ging niet meer in oplossing, nadat hiervan was afgefiltreerd, werd gekoelde alcohol van 96 % toegevoegd, eerst tot 60 %, waarbij geen noemenswaardige uitvlokking optrad en vervolgens tot 80 %. Daarbij deed zich het verschijnsel voor, dat de amylase aanvankelijk in het geheel niet wilde uitvlokken, wel ontstond een sterke opalescentie. Na toevoegen van een weinig KH_2PO_4 trad spoedig uitvlokking op. Klaarblijkelijk werd de oplossing door het fosphaat bij het iso-electrisch punt van het aanwezige eiwit gebracht, waardoor ontlading optrad van het reeds door den alcohol gedehydrateerde sol.¹⁾ Het neerslag werd op de beschreven wijze

1) Zie H. R. KRUYT, Colloids, New-York (1927), pag. 197-'8.

gefiltreerd en gedroogd. Bij de diffusie in zetmeelhoudende gelatine vertoont de tweede fractie een breeden paarsen ring, zooals in fig. 1a afgebeeld is. Het oorspronkelijke moutextract geeft onder dezelfde omstandigheden een veel smalleren ring, zoodat, in overeenstemming met WIJSMAN, een gedeeltelijke scheiding der beide enzymen heeft plaatsgevonden. De tweede fractie diende als praeparaat van α - β -moutamylase. Het stelt een roomkleurig poeder voor, dat in water restloos oplost. De opbrengst, na de tweede praecipitatie, bedroeg 5,5 gr.

3 — *Bereiding van β -moutamylase*

Voor de bereiding van een droog praeparaat van β -moutamylase werd uitgegaan van parelgort uit den kleinhandel. Een drietal monsters werd gemalen, met water geëxtraheerd en een druppel van elk der extracten op een zetmeel-gelatineplaat gebracht. Twee monsters vertoonden nog een duidelijk kleurloos veld met een zeer breeden ring, bij het derde monster was het kleurloze veld slechts uiterst klein. Van het laatste werden daarom 3 KG. aangeschaft en gesorteerd, dwz. alle vreemde bestanddeelen en slecht gepelde korrels werden eruit verwijderd. De rest werd gemalen en met tweemaal zijn gewicht aan alcohol van 50 % gedurende 2 uur onder voortdurend roeren geëxtraheerd. Uit het gefiltreerde extract werd de amylase neergeslagen met alcohol tot 80 %, het neerslag gefiltreerd en gedroogd. Vervolgens werd het opnieuw opgelost in alcohol van 50 %, van het niet in oplossing gegane deel afgefiltreerd en uit het filtraat op de beschreven wijze het droge praeparaat vervaardigd. Ook hier bleek bij de tweede praecipitatie toevoeging van een weinig zuur K-phosphaat noodzakelijk voor de uitvloking. Het was daardoor niet te vermijden dat dit praeparaat, evenals trouwens dat van α - β -moutamylase een weinig van dit zout bevatte.

De β -moutamylase vertoont bij diffusie geen spoor meer van een kleurloos veld. Opbrengst: 5,2 gr. van een nagenoeg wit poeder, dat bij oplossing in water slechts een geringe rest achterlaat.

Alle praeparaten werden in een vacuum-exsiccator tot constant gewicht gedroogd, daarna in kleine fleschjes van bruin glas in een gewonen exsiccator boven geconc. H_2SO_4 gezet en daarin bewaard.

Hun eigenschappen (kleur, reuk, activiteit) zijn in den loop van een jaar niet merkbaar veranderd. Zij zijn vrij van maltase, wat geconstateerd werd, door ze bij een oplossing van maltose te voegen. De draaiing van het mengsel veranderde niet in verloop van 48 uur.

Een enzymoplossing werd op de volgende wijze bereid. Daar de poeders eenigszins vettig zijn, zijn zij moeilijk te bevochtigen en moeten daarom met water worden aangewreven. De afgewogen hoeveelheid, in een bepaald geval b.v. 100 mgr., werd dus in een mortier geschud, met weinig gedest. water aangewreven, vervolgens meer water toegevoegd en gewreven totdat alles, wat aan den bodem van het mortier en aan den stamper kleefde, was opgelost. De oplossing werd dan gespoeld in een Erlenmeyer-kolfje van bekend gewicht en nog zooveel water toegevoegd tot het gewicht van den inhoud 100 gr. bedroeg, daarna gefiltreerd. Een dergelijke oplossing zal in het vervolg als een „enzymoplossing $\frac{1}{1000}$ ” worden aangeduid. Voor iedere proef, of bij elkaar behorende serie van proeven, werd een versche oplossing gemaakt. De oplossingen werden, gedurende den tijd, dat zij niet in gebruik waren, in een koelkast (5—8° C.) bewaard, nadat er een weinig thymol aan was toegevoegd.

4 — *Bereiding van oplosbaar zetmeel*

Bij de meeste proeven werd als substraat oplosbaar zetmeel gebruikt, en wel een praeparaat, dat volgens een eenigszins gemodificeerde methode van LINTNER ¹⁾ uit aardappelmeel van de „Pharmaceutische Groothandel” te Utrecht bereid werd. WIJSMAN heeft reeds opgemerkt, dat men een beter oplosbaar product verkrijgt, wanneer men het zetmeel i.p.v. 7 dagen, zooals LINTNER voorschrijft, 10 dagen bij kamertemperatuur met zoutzuur van $7\frac{1}{2}$ % behandelt. Daarbij is het van belang, dat men het zuur om den anderen dag ververscht.

Door mij werd ook op deze wijze te werk gegaan; 400 gr. aardappelmeel werden in een bekerglas met zooveel zuiver zoutzuur van $7\frac{1}{2}$ % overgoten, dat de vloeistof eenige centimeters boven het bezonken meel kwam te staan. De kamertemperatuur bedroeg gemiddeld 20° C. Om den anderen dag werd nu dit zuur afgeschonken

1) C. J. LINTNER, J. f. Prakt. Chem. N. F. 34, 378 (1886).

en door versch vervangen, waarbij de massa flink werd doorgeroerd. Het zuur nam de eerste malen een eenigszins gele tint aan, later bleef het volkomen kleurloos. Na 10 dagen ($5\times$ ververschen) werd het meel, dat nu veel minder „pakte” dan vóór de behandeling, herhaalde malen met water, daarna eenige malen met aethylalcohol van 96 % gewasschen, afgefiltreerd, met aether gedroogd en tenslotte ter definitieve droging gebracht in een vacuum-exsiccator boven geconc. H_2SO_4 . In het volgende hoofdstuk zal worden beschreven, hoe het gehalte van dit praeparaat aan zuiver amylum werd bepaald en op welke wijze de gebruikte oplossingen werden bereid.

Waarop de werking van het zoutzuur berust is niet met zekerheid bekend. Op grond van later te vermelden ervaringen ¹⁾ kwam ik er toe, nog eenige andere praeparaten te maken, die van het eerste alleen hierin verschilden, dat zij langer met zuur behandeld werden, n.l. resp. 12 en 14 dagen, met telkens eenmaal meer ververschen. Deze praeparaten, welke zeer heldere oplossingen gaven, vertoonden met β -moutamylase een grootere reactiesnelheid dan het eerste en werden door dit enzym ook iets verder afgebroken. Toch bezaten alle praeparaten dezelfde, geringe, eigenreductie, zoodat de oplosbaar-makende werking van het zoutzuur niet het gevolg kan zijn van een steeds verder gaande hydrolyse. Op een en ander zal in het laatste hoofdstuk worden teruggekomen.

5 — *Omtrent de uitvoering der diffusieproeven* mogen hier tenslotte nog enkele bijzonderheden volgen.

De benoodigde hoeveelheid gelatine werd met een weinig water opgesmolten in een warmwaterbad en het zetmeel afzonderlijk in kokend water opgelost. De oplossingen werden dan bij elkaar gegoten, zooveel water toegevoegd als noodig was en het mengsel even opgekookt. Vervolgens werd het uitgegoten in gesteriliseerde Petri-schalen, zoo, dat de bodem even bedekt was. Op de oppervlakte van de gestolde plaat werd dan een weinig van het amylase-poeder gebracht, b.v. met behulp van een vochtig glazen staafje.

Aanvankelijk gelukte het mij niet het ringverschijnsel scherp te zien te krijgen. De proeven werden in den zomer uitgevoerd en de

1) Zie pag. 53.

kamertemperatuur was steeds boven 20° C. Toen een zeer warme dag mij noodzaakte de platen in de koelkast te bewaren, bemerkte ik, dat bij lage temperatuur de randen der diffusie-velden en ringen zeer scherp begrensd verschenen. De *eerste fractie*, vóór de verhitting, vertoonde nu een smallen ring, terwijl bij temperaturen boven 20° geen ring te constateeren was geweest. Hoe stijver de gelatine, hoe nauwer de capillairen van het gel, hoe scherper dus blijkbaar het verschijnsel uitvalt. Dit bleek ook uit eenige proeven met zetmeel-gelatineplaten, welke slechts 2 % gelatine bevatten. De verschillende amylase-paerparaten gaven in deze platen bij 6° dezelfde vage diffusiebeelden te zien als in platen van 8 % bij 25° . In het vervolg liet ik de diffusie daarom steeds in de koelkast verlopen.

III

DE INVLOED DER H-IONEN OP DE REACTIE-SNELHEID DER BEIDE AMYLASEN

1 — *Inleiding*

Aangezien de kromme, die men verkrijgt door de beginsnelheid van de reactie af te zetten tegen de H-ionen-concentratie in het reactiemengsel en die hier kortweg de pH-kromme zal worden genoemd, tot de meest belangrijke karakteristika van een enzym gerekend moet worden, besloot ik mijn praeparaten in de eerste plaats op dit punt te onderzoeken.

Een verklaring van het verband, dat er bestaat tusschen reactiesnelheid en pH, heeft MICHAELIS ¹⁾ trachten te geven. De theorie van MICHAELIS, welke in de eerste plaats is opgesteld voor de saccharase (invertine), vindt men in alle handboeken en monografieën over enzymen uitvoerig behandeld ²⁾; hier moge met het volgende worden volstaan.

Wanneer men een ampholyt, dus een electrolyt, die zoowel H^+ als OH^- vermag af te splitsen, b.v. een aminozuur, in oplossingen van verschillenden zuurgraad brengt, dan treedt in de meeste gevallen dissociatie op, dwz. men heeft in de oplossing naast ongesplitste (ongeladen) moleculen negatief geladen moleculen en H-ionen, of wel positief geladen moleculen en OH^- -ionen. Zet men nu het percentage *ongesplitste* moleculen af tegen de pH, dan krijgt men een kromme, die een maximum vertoont bij het iso-electrisch punt van het gebruikte ampholyt. Verschillende ampholyten geven een verschillend verloop van de kromme, in sommige gevallen is

1) L. MICHAELIS und H. DAVIDSOHN, Biochem. Zts, **35**, 386 (1911).

2) Zie o.m. H. v. EULER, Chemie der Enzyme (1925), Teil I, pag. 62 en J. B. S. HALDANE, Enzymes (1930), pag. 12.

het maximum scherp en hebben de beide takken van de kromme een steil verloop, in andere gevallen is er een vlak maximum, dwz. over een zeker pH-traject vindt nagenoeg geen dissociatie plaats.

Bij vele enzymen neemt men nu iets dergelijks waar, wanneer men de reactiesnelheid tegen de pH afzet. MICHAELIS kwam er zodoende toe, een enzym te vergelijken met een ampholyt en te veronderstellen, dat alleen de ongeladen moleculen ¹⁾ katalytisch werkzaam kunnen zijn. Dit houdt natuurlijk in, dat het optimum der enzymatische werking overeen moet komen met het iso-elektisch punt van de enzymoplossing, dat door kataphorese kan worden bepaald. Voor de gezuiverde gist-saccharase schijnt de theorie van MICHAELIS vrijwel op te gaan, tenminste wat de ligging van het optimum en het verloop van de pH-kromme aan de alkalische zijde van het optimum betreft. Aan de zure zijde treden dikwijls complicaties op. In de meeste gevallen echter komt het iso-elektisch punt niet overeen met het punt van optimale activiteit. Dit zou dan zoo verklaard moeten worden, dat het hier de negatief of positief geladen enzymmoleculen zijn, welke katalytisch werken.

De theorie heeft later een zekere wijziging ondergaan ²⁾, doordat aangenomen wordt dat, zooals reeds door vroegere onderzoekers was verondersteld ³⁾, zich tusschen enzym en substraat een verbinding vormt en dat het de dissociatie *van deze verbinding* is, die het verloop van de pH-kromme bepaalt.

Van moutamylase is het verloop van de pH-kromme door verscheidene onderzoekers uitvoerig bestudeerd. ADLER ⁴⁾ gebruikte daarbij verschillende bufferstoffen en vond een optimum tusschen pH 4,7 en 5,15, eenigszins afhankelijk van den aard der buffer (phosphaat en acetaat). In het bijzonder wordt door hem de nadruk gelegd op de rol, die de anionen der toegevoegde zouten spelen kunnen bij de bepaling der pH-krommen.

1) Daar de enzymen kolloide oplossingen vormen, komen hier natuurlijk alleen de moleculen in aanmerking, die zich aan de oppervlakte der deeltjes bevinden. Door de meeste physiologen wordt dit over het hoofd gezien.

2) L. MICHAELIS und M. L. MENTEN, Biochem. Zts, **49**, 333 (1913).

3) A. J. BROWN, Trans. Chem. Soc. London, **81**, 373 (1902) en V. HENRI, Thèse, Paris (1903).

4) L. ADLER, Biochem. Zts. **77**, 146 (1916).

SHERMAN, THOMAS en BALDWIN ¹⁾ vinden een optimum bij pH 4,4—4,5 en een zeer langzame daling van de kromme naar de alkalische zijde. Later hebben SHERMAN, CALDWELL en ADAMS ²⁾ aangetoond, dat het optimum *bij verhooging van temperatuur*, waarbij men de reactie laat verlopen, *naar de alkalische zijde verschuift*. Bij 40° C. vinden zij het optimum tusschen pH 4,5 en 5,0; bij 70° ligt dit tusschen pH 5,3 en 5,8 (phosphaatbuffer). Dit resultaat is van belang, aangezien immers bij 70° de β -moutamylase snel vernietigd wordt, terwijl in het oorspronkelijke mengsel de werking van deze component op den voorgrond treedt, zoodat de door SHERMAN waargenomen verandering dus neerkomt op een verschuiving van het optimum van de β -moutamylase naar dat van de α -moutamylase. Wij zullen zien, dat de door mij verkregen resultaten zich bij die van SHERMAN goed aansluiten.

Ook EULER en SVANBERG hebben de pH-kromme van moutamylase bepaald ³⁾. Zij vinden een optimum bij pH 5,0 en aan de *alkalische zijde* daarvan een verloop van de kromme, dat goed in overeenstemming te brengen was met de theorie van MICHAELIS.

ERIK OHLSSON ⁴⁾ is de eerste en tot nog toe de eenige geweest, die de pH-krommen *der beide moutamylasen afzonderlijk* heeft bepaald. De wijze, waarop hij de enzymen scheidt, is reeds in het eerste hoofdstuk besproken. Door hem is gewerkt met fosphaatmengsel als bufferstof en de pH werd gemeten met de quinhydronelectrode. De activiteit van de „saccharogeen-amylase” (β -moutamylase) werd bepaald volgens de methode der quantitative suikerbepaling. Dit enzym vertoont een groot gebied van hoge werkzaamheid, met een optimum bij pH 4,9 ongeveer. De „dextrinogeen-amylase” (α -moutamylase), waarvan de activiteit bepaald werd met de jodiummethode volgens WOHLGEMUTH, waarbij wordt nagegaan in hoeveel tijd de jodiumreactie omslaat van blauw in paars of wel geheel verdwijnt, bezit daarentegen slechts een smal gebied van optimale werkzaamheid bij pH 5,75. Bovendien is het verloop der

1) H. C. SHERMAN, A. W. THOMAS and M. E. BALDWIN, J. Am. Chem. Soc., **41**, 231 (1919).

2) H. C. SHERMAN, M. L. CALDWELL and MILDRED ADAMS, J. Am. Chem. Soc., **49**, 2000 (1927).

3) H. v. EULER und O. SVANBERG, H. **112**, 193 (1920).

4) l. c. pag. 13.

kromme hier veel steiler, dan bij „saccharogeen-amylase”. De enzymen vertoonen dus op dit punt een aanzienlijk verschil. OHLSSON heeft ook nog getracht de pH-kromme van de „dextrinogeen-amylase” te bepalen uit het reduceerend vermogen van het reactiemengsel. De zoo verkregen kromme viel niet samen met die, welke volgens de jodiummethode bepaald was, zij was echter evenmin identiek met die van de „saccharogeen-amylase”. Het is niet duidelijk, waaraan dit gebrek aan overeenstemming moet worden toegeschreven. Tenslotte zij nog vermeld, dat het verhitte extract een enigszins ander verloop van de pH-kromme aan de alkalische zijde van het optimum vertoonde, dan de „dextrinogeen-amylase” in de oorspronkelijke moutoplossing. OHLSSON kon dit verklaren, door aan te toonen, dat de moutoplossing een stof bevat, die belemmerend op de „dextrinogeen-amylase” werkt. Deze stof wordt bij verwarming vernietigd.

De voornaamste bezwaren, die men tegen het werk van OHLSSON inbrengen kan werden reeds in het eerste hoofdstuk naar voren gebracht. Zij zijn hierin samen te vatten: ten eerste heeft OHLSSON de enkelvoudigheid van zijn praeparaten niet overtuigend bewezen en ten tweede is het een open vraag gebleven, in hoeverre de eigenschappen van zijn praeparaten beïnvloed zouden kunnen zijn door de voorbehandeling (verhitten of aanzuren).

Dit alles maakte een contrôle met de volgens WIJSMAN bereidde praeparaten zeer wenschelijk. Ik had daarbij dadelijk het voordeel dat de β -moutamylase zonder een zoo krachtdadige behandeling, als het brengen op een hoogen zuurgraad, verkregen was.

In het volgende zal nu eerst een beschrijving gegeven worden van de door mij gevolgde methode bij de bepaling der reactiesnelheden.

2 — Methodiek

Alle reacties vonden plaats bij een temperatuur van 40° C. Daartoe werd gebruik gemaakt van een, van een roerder voorzienen, waterbad-thermostaat, welke door een tetrachlooraethaan-kwik-regulateur op de genoemde temperatuur werd gehouden met afwijkingen van ten hoogste $0,02^{\circ}$ naar boven of naar beneden.

In den thermostaat bevond zich een koperen ring met klemmen, waarin de reactiekolven (Erlenmeyerkolven van 100 of 200 ccm.)

zoo met den hals konden worden vastgeklemd, dat zij zich geheel onder water bevonden; verder een in $0,1^\circ$ verdeelden thermometer, welke bij 40° met den normaalthermometer vergeleken en zonder noemenswaardige afwijkingen bevonden was.

De maltose-bepalingen geschieden volgens SCHOORL ¹⁾. Daarvoor worden in een Erlenmeyerkolf van Jenaglas van 300 ccm. 10 ccm. CuSO_4 -oplossing, welke 69,278 gr. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ „pro Analyse” per L. bevat, gepipeteerd en vervolgens 10 ccm. Seignette-natron (346 gr. Seignettezout en 100 gr. NaOH in 1 L.). Hierbij wordt dan 10 of 25 ccm. van het te onderzoeken reactiemengsel gepipeteerd en zooveel water toegevoegd, dat het totale volumen 50 ccm. bedraagt. De vloeistof wordt in 3 min. tot koken verhit en gedurende precies 2 min. aan de kook gehouden, waarbij de kolf op een gaasje staat, bedekt met asbest, waarin een voor de kolf passende opening is uitgesneden. Dan wordt snel in koud water gekoeld tot ca. 25° , 10 ccm. KJ-oplossing van 30 % toegevoegd en daarna 10 ccm. H_2SO_4 van 25 %. Het vrij gekomen jodium wordt met 0,1 N. Na-thiosulfaat getitreerd, waarbij een zetmeeloplossing van 2 % als indicator dienst doet. Men bepaalt op deze wijze het restant cupri. Dit wordt van een bepaling in blanco afgetrokken en uit het verschil in ccm. 0,1 N. thio met behulp van een tabel ²⁾ de hoeveelheid maltose berekend.

— Als bufferstof werd citraatmengsel gekozen. Uit 0,1 N. sec. Na-citraat, dat een pH vertoont van 5,0 is door toevoeging van 0,1 N. HCl resp. 0,1 N. NaOH gemakkelijk een serie buffermengsels samen te stellen, welke het te onderzoeken traject bestrijken. De bepaling van de aciditeit geschiedde colorimetrisch en wel met den „Doppelkeil-Kolorimeter” volgens BJERRUM-ARRHENIUS. Dit apparaat bestaat uit een lang rechthoekig glazen bakje, dat door een diagonaalsgewijs geplaatste glazen plaat in twee wigvormige helften verdeeld is. In beide helften bevindt zich een gelijke hoeveelheid indicator-oplossing. Door toevoeging van 10 druppels 0,1 N. NaOH in de eene helft, wordt hierin de extreem-alkalische kleur van den indicator opgewekt; in de andere helft wordt de extreem-zure kleur

1) N: Schoorl, Chem. Weekbl., 9, 678 (1912).

2) Chem. Jaarboekje der Ned. Chem. Vereen., Deel II, pag. 107 (1930).

te voorschijn gebracht met 10 druppels 0,1 N. HCl. Bij doorzicht in horizontale richting krijgt men dus alle overgangen tusschen deze twee kleuren te zien. Langs het bakje kan een prisma-comparator geschoven worden, waarin zich een reageerbuisje bevindt met 5 ccm. van de te onderzoeken vloeistof, voorzien van denzelfden indicator. De verhouding van de hoeveelheid indicator in het bakje tot die in het buisje staat vast en moet zorgvuldig in acht genomen worden om vergelijking mogelijk te maken. Heeft de vloeistof een eigen kleur of is zij troebel, dan kan zij zonder indicator, in een reageerbuisje van dezelfde breedte, zoo in den comparator geplaatst worden, dat de verschillen in kleur of intensiteit worden gecompenseerd. Achter het bakje staat een belichtings-apparaat, bestaande uit een metalen kastje met matglazen ruit, waarbinnen zich twee Philips daglichtlampen bevinden. Op den comparator bevindt zich een pijltje, dat langs een schaalverdeeling schuift, waarvan het nulpunt correspondeert met het midden van de wig; op dit punt ziet men dus, in de onderste beeld helft, de neutrale kleur van den indicator; de pH van dit punt is voor elk der gebruikte indicatoren bekend, zij bedraagt b.v. voor methylo-rood 5,1. De comparator wordt nu zoo lang verschoven tot de kleuren van de beide beeld helften met elkaar overeen komen en de stand van het pijltje afgelezen; staat dit nu bij gebruik van methylo-rood op het cijfer 2 aan de *rechterzijde* van het nulpunt, dan is de pH van de onderzochte vloeistof $5,1 + 0,2 = 5,3$; staat het op 2,5 aan de *linkerzijde*, dan is de pH $5,1 - 0,25 = 4,85$. De wig wordt steeds zoo geplaatst, dat de alkalische kleur zich aan de rechterzijde bevindt. Verschillen van 0,05 zijn direkt af te lezen, 0,01 kunnen worden geschat; daar de nauwkeurigheid echter niet zoo ver gaat, heb ik de gevonden waarden steeds afgerond op 0,05.

Een serie citraat-mengsels werd nu gemaakt, waarvan de pH bij benadering bekend was. De nauwkeurige bepalingen geschieden met de met driemaal hun volumen gedest. water verdunde oplossingen, aangezien de oplossing in het reactiemengsel ook in deze verdunning aanwezig was. Bovendien werd, na afloop der suiker-bepalingen, de pH van het reactiemengsel zelf onderzocht. Steeds werd een goede overeenstemming gevonden, met uitzondering van eenige reactiemengsels, alkalischer dan pH 6,9; hier was blijkbaar de buffercapaciteit van het mengsel zoo gering, dat de eigen zuur-

graad van zetmeel en enzym (dat immers een weinig KH_2PO_4 bevat) een rol ging spelen. In deze gevallen is natuurlijk alleen met den zuurgraad van het *reactiemengsel* rekening gehouden.

Daar de temperatuur een niet geheel te verwaarloozen invloed heeft, werden de buisjes met vloeistof en indicator in den thermostaat op 40° gebracht, daarna vlug in den comparator geplaatst en de bepaling zoo snel mogelijk uitgevoerd.

3 — Vervolgens zullen eenige *voorbereidende werkzaamheden* worden beschreven.

Een voorraadsoplossing van 6 L. Na-thiosulfaat, welke per L. 100 mgr. kwikcyanide bevatte ter conserveering, bevond zich in een flesch, voorzien van een hevel met klemkraan en een buisje met natronkalk. De titer van de thio werd bepaald met 0,1 N. KJO_3 „pro Analyse” en bedroeg 0,098, zij werd van tijd tot tijd gecontrôleerd doch vertoonde geen merkbare verandering. Voor alle bepalingen werd dezelfde geijkte buret gebruikt, eveneens voorzien van een natronkalkbuisje; verder werd gebruik gemaakt van geijkte pipetten van 1, 5, 10 en 25 ccm.

Van de CuSO_4 -oplossing werd 1 L. gemaakt, bij vernieuwing daarvan moest natuurlijk telkens een blanco-bepaling worden verricht.

Bepaling van het gehalte van het zetmeel aan zuiver amyllum

Van het zetmeelpraeparaat werden 5 gr. in een mortier met water aangewreven en gespoeld in een kolf van bekend gewicht met 150 ccm. gedest. water, dat even van de kook was. Vervolgens werd de oplossing weer tot koken verhit en gedurende $\frac{1}{2}$ uur zachtjes aan den kook gehouden, daarna afgekoeld en ingewogen tot 250 gr.

Van deze oplossing werden 20 ccm. gevoegd bij 20 ccm. zuiver zoutzuur van 5 % in een Erlenmeyerkolfje van 100 ccm. en het mengsel 3 uur aan een terugvloeikoeler in een kokend waterbad verhit, na afkoeling geneutraliseerd met vast Na-carbonaat, in een maatkolfje van 100 ccm. gespoeld en tot de streep aangevuld met gedest. water. Hiervan werden 10 ccm. gevoegd bij de versch-bereide „Fehling” en op de beschreven wijze het restant cupri bepaald.

blanco bepaling	teruggetitreerd
27,05 ccm. thio.	14,86 ccm. thio.
27,04	14,82
	14,80

Verschil: 12,24 ccm. 0,098 N. thio = 12,00 ccm. 0,1 N. wat overeen komt met 35,5 mgr. amylum. Opgelost was in het zelfde volumen 40 mgr. van het praeparaat, zoodat het gehalte dus bedroeg 88,8 %. Om 1 L. van een werkelijke 2 % zetmeeloplossing (2 gr. zetmeel in 100 gr. opl.) te maken, moesten dus 22,52 gr. worden opgelost; dit geschiedde op de zoo juist beschreven wijze. De oplossing werd bij kamertemperatuur bewaard, nadat er een weinig thymol aan was toegevoegd. Haar zuurgraad bedroeg pH 4,2.

Eigenreductie van het zetmeel

Van de 2 % zetmeeloplossing gaven 10 ccm. een titratieverschil van 0,76 ccm. 0,98 N. thio. Bij de maltosebepalingen werd hiermede rekening gehouden door dit bedrag, of een deel ervan, van de blanco-bepaling af te trekken.

Eigenreductie der enzympraeparaten

Van elk der gebruikte enzympraeparaten gaven 20 mgr. een titratieverschil van ca. 0,1 ccm. thio; gezien de geringe hoeveelheid enzym, welke zich in de reactiemengsels bevond, behoefde dit niet in rekening te worden gebracht.

4 — *De pH-kromme van β -moutamylase*

Aangezien de gang van zaken bij alle reactiesnelheidsbepalingen dezelfde was, zal deze slechts eenmaal uitvoerig worden beschreven.

Het reactiemengsel zonder enzym en de enzymoplossing werden afzonderlijk in den thermostaat gehangen totdat zij de temperatuur van het water aangenomen hadden, wat na 20—30 min. het geval was. Vervolgens werd op een nauwkeurig bekend tijdstip de benodigde hoeveelheid enzymoplossing in het reactiemengsel gepipeet, waarbij als beginpunt van de reactie werd beschouwd het oogenblik, dat de pipet voor de helft was leeggevloeid. De goed gesloten kolf werd daarna even flink omgeschud. Na een bepaalden tijd werd met een droge pipet een hoeveelheid (10 ccm. of 25 ccm.) uit de kolf genomen en dit gevoegd bij de, eenige minuten van te

voren bereide „Fehling”, waardoor de reactie onmiddelijk tot stilstand kwam. Dit geschiedde zoo, dat het eindpunt van de reactie ook weer viel op het oogenblik, dat de pipet voor de helft was leeggelopen. Vervolgens werd onmiddelijk op de beschreven wijze de maltose bepaald.

De reactiesnelheid van de β -moutamylase werd bij 14 verschillende zuurgraden bepaald. Het reactiemengsel had daarbij de volgende samenstelling.

- 50 ccm. 2 % zetmeelopl.
- 25 ccm. 0,1 N. citraatmengsel.
- 15 ccm. aq.dest.
- 10 ccm. enzymopl. $\frac{1}{1000}$.

Aan de hand van eenige oriënteerende proeven was vastgesteld, hoeveel enzym moest worden toegevoegd, om de reactie in een geschikt tempo te doen verlopen.

Bij iederen zuurgraad werden 3—6 suikerbepalingen verricht met tusschenpoozen van 1—2 uur. De resultaten vindt men in de tabellen I t/m XIV (zie pag. 37 en 38). Vermeld zij nog, dat bij alle bepalingen dezelfde enzymoplossing en dezelfde zetmeeloplossing gebruikt werden.

In de eerste kolom van iedere tabel is de tijd aangegeven in uren, in de tweede de hoeveelheden maltose in mgr. per 10 ccm. van het reactiemengsel. In de derde vindt men de *reactiesnelheid* V vermeld, uitgedrukt in mgr. maltose per uur. De gemiddelde reactiesnelheid over de eerste 2 of $2\frac{1}{2}$ uur diende voor het opstellen der pH-kromme, afgebeeld in fig. 2. Men ziet daaruit, dat de β -moutamylase haar grootste werkzaamheid vertoont tusschen pH 4,55 en 5,15. Naar de zure zijde vindt een veel snellere vermindering plaats, dan naar de alkalische. Klaarblijkelijk wordt bij een H-ionen-concentratie, hoger dan pH 4,5, het enzym langzamerhand vernietigd. Dit komt ook in de tabellen tot uiting. Binnen het gebied van optimale werkzaamheid vertoont de V een langzame daling, naar de zure zijde gaat deze daling steeds sneller, naar de alkalische zijde wordt zij daarentegen geringer, dwz. de reactie krijgt hier steeds meer de neiging om rechtlijnig te verlopen. Vergelijkt men b.v. tabel III met tabel X dan ziet men duidelijk het verschil. Bij pH 4,20 is de beginsnelheid van de reactie tamelijk hoog, om dan vrij snel te

TABEL I pH 3,60

t uren	X mgr. malt.	V x/t
1	3,8	3,8
2	3,5	1,8
3	3,6	1,2

TABEL II pH 3,85

t uren	X mgr. malt.	V x/t
1	7,7	7,7
2	12,7	6,4
4	19,6	4,9
5	22,2	4,4
6	23,8	4,0

TABEL III pH 4,20

t uren	X mgr. malt.	V x/t
1	8,9	8,9
2	15,6	7,8
4	28,6	7,1
5	33,3	6,7
6	36,4	6,1
7	40,6	5,8

TABEL IV pH 4,55

t uren	X mgr. malt.	V x/t
1½	14,5	9,7
2½	22,3	8,9
4	32,0	8,0
5½	41,2	7,5
8	50,7	6,3

TABEL V pH 4,80

t uren	X mgr. malt.	V x/t
1	9,6	9,6
2	18,5	9,2
4	33,6	8,4
5	39,8	8,0
6	44,0	7,3
7	47,8	6,8

TABEL VI pH 5,15

t uren	X mgr. malt.	V x/t
1½	14,5	9,7
2½	22,6	9,0
4	33,2	8,3
5½	41,3	7,5
8	51,6	6,5

TABEL VII pH 5,35

t uren	X mgr. malt.	V x/t
1	9,5	9,5
2	17,8	8,9
4	32,7	8,2
5	37,9	7,6
6	43,3	7,2
7	47,5	6,8

TABEL VIII pH 5,85

t uren	X mgr. malt.	V x/t
1	8,9	8,9
2	15,3	7,7
4	29,1	7,3
5	35,3	7,1
6	39,5	6,6

TABEL IX pH 6,20

t uren	X mgr. malt.	V x/t
1	8,3	8,3
2	15,4	7,7
3	22,6	7,5
4	29,2	7,3
5	34,9	7,0
6	39,8	6,6

TABEL X pH 6,65

t uren	X mgr. malt.	V x/t
1	7,2	7,2
2	15,5	7,7
3	21,9	7,3
4	28,3	7,1
5	33,3	6,7

TABEL XI pH 6,90

t uren	X mgr. malt.	V x/t
1	7,4	7,4
2	14,4	7,2
4	26,6	6,7
5	31,4	6,3
6	37,2	6,2

TABEL XII pH 7,10

t uren	X mgr. malt.	V x/t
1	6,8	6,8
2	13,5	6,7
4	25,6	6,4
5	30,8	6,2

TABEL XIII pH 7,35

t uren	X mgr. malt.	V x/t
1	6,1	6,1
3	19,0	6,3
4	24,5	6,1
5	28,6	5,7

TABEL XIV pH 8,15

t uren	X mgr. malt.	V x/t
1½	7,3	4,9
2½	12,5	5,0
3½	16,2	4,6
4½	20,3	4,5
5½	23,6	4,3

TABEL XV

pH 4,80

t uren	X mgr. malt.	V x/t	k. 10 ⁴ a = 100	k'. 10 ⁴ a = 62
1	23,5	23,5	40,5	67,0
2	45,3	22,7	41,0	70,0
3	65,5	21,8	41,0	74,0
4	82,7	20,7	40,7	76,5
5½	103,8	18,9	39,4	79,4
22	164,4			
70	163,7 = 62%			

dalen; bij pH 6,65 daarentegen is de V van den beginne af veel geringer, zij blijft hier echter gedurende eenige uren nagenoeg constant.

Een meer volledig beeld van de reactie krijgt men in tabel XV te zien. In dit geval bedroeg het reactiemengsel 200 ccm. terwijl voor iedere bepaling 25 ccm. gebruikt werd. De eerste drie kolommen komen overeen met die van de andere tabellen. Er is uit te zien, dat de reactie eindigt bij de vorming van 64 mgr. maltose per 25 ccm. d.i. 62 % van de theoretisch mogelijke hoeveelheid, een bedrag, dat in de buurt ligt van de door BAKER, LING en SJOEBERG (l.c.) gevonden afbraakgrens bij gebruik van amylase uit ongekiemde gerst.

Toevoegen van versch enzym had geen verhooging van de opbrengst tengevolge, zooals uit de volgende proef blijkt.

Drie kolfjes van 100 ccm. werden elk voorzien van:

10 ccm. 2 % zetmeelopl.

5 ccm. 0,1N. citraatmengsel. pH 5,40

3 ccm. aq.dest.

2 ccm. enzymopl. $\frac{1}{1000}$

Alle kolfjes werden in den thermostaat gezet, na 20, resp. 26 uur de inhoud van twee er van gespoeld in de kolf met „Fehling” en het maltose-gehalte bepaald.

a) 129,8 mgr. malt. 61,5 % v. d. theorie.

b) 130,4 „ „ 61,8 % „ „

Bij het derde kolfje werd opnieuw 2 ccm. enzymoplossing gevoegd en 24 uur later het maltose-gehalte bepaald.

c) 130,8 mgr. malt. 62 %.

In de vierde en vijfde kolom van tabel XV vindt men de *reactiesnelheids-constante* van de monomoleculaire reactie op twee manieren berekend.

SHERMAN en WALKER ¹⁾ vinden n.l. voor met alcohol neergeslagen moutamylase (α - β -moutamylase) een nagenoeg constante k , bij gebruik van een *geringe enzymconcentratie* (hoogere concentraties gaven een dalende k), wanneer zij in de formule

$$k = \frac{1}{t} \lg n. \frac{a}{a-x}$$

1) H. C. SHERMAN and J. A. WALKER, J. Am. Chem. Soc., 39, 1489 (1917).

voor a de in totaal aanwezige hoeveelheid zetmeel nemen aan het begin van de reactie; x is de in den tijd t omgezette hoeveelheid, berekend uit de gevormde hoeveelheid maltose. Daarnaast vinden EULER en SVANBERG ¹⁾, bij een dergelijk praeparaat een bij benadering constante k , wanneer zij a gelijk stellen aan de in *maximo* omgezette hoeveelheid zetmeel, dat was in hun geval 75 %.

In de vierde kolom nu vindt men de k , vermenigvuldigd met 10^4 , berekend voor $a = 100$ %; in de vijfde kolom k' voor $a = 62$ %, waarbij dus verondersteld is, dat slechts 62 % van het in den beginne aanwezige zetmeel als substraat mag worden beschouwd. Zooals men ziet is k nagenoeg constant, terwijl k' een stijging vertoont. Wij moeten echter wel bedenken, dat wij hier met een heterogene reactie te doen hebben, zoodat het constant zijn van de k ons niets zegt omtrent het werkelijke verloop van de hydrolyse. Bovendien is gebleken, dat k alleen maar constant is bij een bepaalde enzymconcentratie, welke hier toevallig gekozen werd voor de bepaling van de pH-kromme. Bij verlaging van de enzymconcentratie vertoont k een stijging, bij verhooging een daling, zooals in hoofdstuk V blijken zal. Daar zal ook op deze kwesties nader worden teruggekomen.

Het reactiemengsel vertoont na afloop der maltose-vorming nog steeds een intensieve *jodiumreactie*. De kleur hiervan wordt door WIJSMAN als paars opgegeven, door BAKER en SJOEBERG (l.c.) als blauw. Het is mij gebleken, dat de kleur afhankelijk is van de relatieve hoeveelheid jodium, die men toevoegt. Vult men een reageerbuis met het uitgereageerde mengsel en voegt men hieraan een druppel 0,02 N. jodiumopl. in KJ toe, dan ontstaat een zeer donkere kleur, die bij verdunning *blauw* blijkt te zijn. Voegt men nu bij dit zeer verdunde mengsel opnieuw een druppel van de genoemde jodiumoplossing, dan wordt de kleur *paars*. Het zelfde verschijnsel kan men ook reeds in zekere mate te zien krijgen bij het oorspronkelijke oplosbare zetmeel, dat in groote verdunning niet meer een zuiver blauwe, maar een violette kleur met jodium geeft.

Het restproduct, dat de blauwe of paarse jodiumreactie geeft, is natuurlijk niets anders dan de „erythrogranulose” van WIJSMAN. Volgens diens ervaring wordt het door β -moutamylase („maltase”)

1) H. v. EULER und O. SVANBERG, H. 112, 193 (1920).

niet aangetast, wel door α -moutamylase („dextrinase”). Het leek mij daarom een geschikt substraat om te gebruiken bij de bepaling van de pH-kromme van het α -moutamylasepraeparaat, aangezien zich hierin nog een geringe hoeveelheid β -moutamylase zou kunnen bevinden.

Bereiding van erythrogranulose

Van het oplosbare zetmeel werden 100 gr. opgelost in 3 L. kokend water en na afkoeling een oplossing van 500 mgr. β -moutamylase toegevoegd, bovendien een weinig thymol, terwijl de pH met behulp van citraatmengsel op 4,8 werd ingesteld. Nadat het mengsel 24 uur in den thermostaat bij 40° gestaan had, werd opnieuw 500 mgr. β -moutamylase toegevoegd en weer 24 uur later de vloeistof even opgekookt en gefiltreerd. Vervolgens werd onder verminderden druk bij 45° C. ingedampt tot ca. $\frac{1}{3}$ van het oorspronkelijke volume en daarna alcohol toegevoegd tot een concentratie van 60 %. Het restproduct sloeg in groote vlokken neer. Het neerslag werd afgefiltreerd, uitgeperst en opgelost in 300 ccm. kokend water. Na afkoeling werd weer met alcohol tot 60 % neergeslagen en vervolgens de bewerking nog eens herhaald. Tenslotte werd de massa met geconc. alcohol gekneed, waardoor zij fijnkorrelig werd, daarna afgefiltreerd, met aether gewasschen en in een vacuum-exsiccator boven H_2SO_4 gedroogd tot constant gewicht.

Van het zoo verkregen poeder werd 1 gr. opgelost in 100 ccm. kokend water en van deze oplossing de eigenreductie en de werking met β -moutamylase onderzocht. Een reduceerend vermogen kon niet geconstateerd worden.

10 ccm. erythrogranulose + 5 ccm. citraatmengsel pH 5,10 + 5 ccm. enzymopl. $\frac{1}{1000}$ gaven na 6 uur een titratieverschil van 0,62 cmm. thio; na 24 uur 1,22 ccm. thio.

Om te zien of deze werking nog te verminderen was, werd de erythrogranulose opnieuw opgelost in 1 L. water en 250 gr. β -moutamylase toegevoegd. Na 24 uur werd opgekookt en de zoo juist beschreven bewerkingen herhaald. Het nu verkregen product vertoonde nog steeds een geringe werking met β -moutamylase (titratieverschil 0,42 ccm. thio in 24 uur).

Reeds door schudden met koud water vormt het een troebele oplossing, gemakkelijker lost het op in kokend water, hoewel ook

daarin de opalescentie blijft bestaan, wat bij het oorspronkelijke oplosbare zetmeel niet het geval was.

Het gehalte aan zuiver amyllum werd op dezelfde wijze als bij oplosbaar zetmeel bepaald en bedroeg 91 %. Een oplossing van 1 % diende als voorraadsoplossing voor de bepaling der pH-kromme van de α -moutamylase.

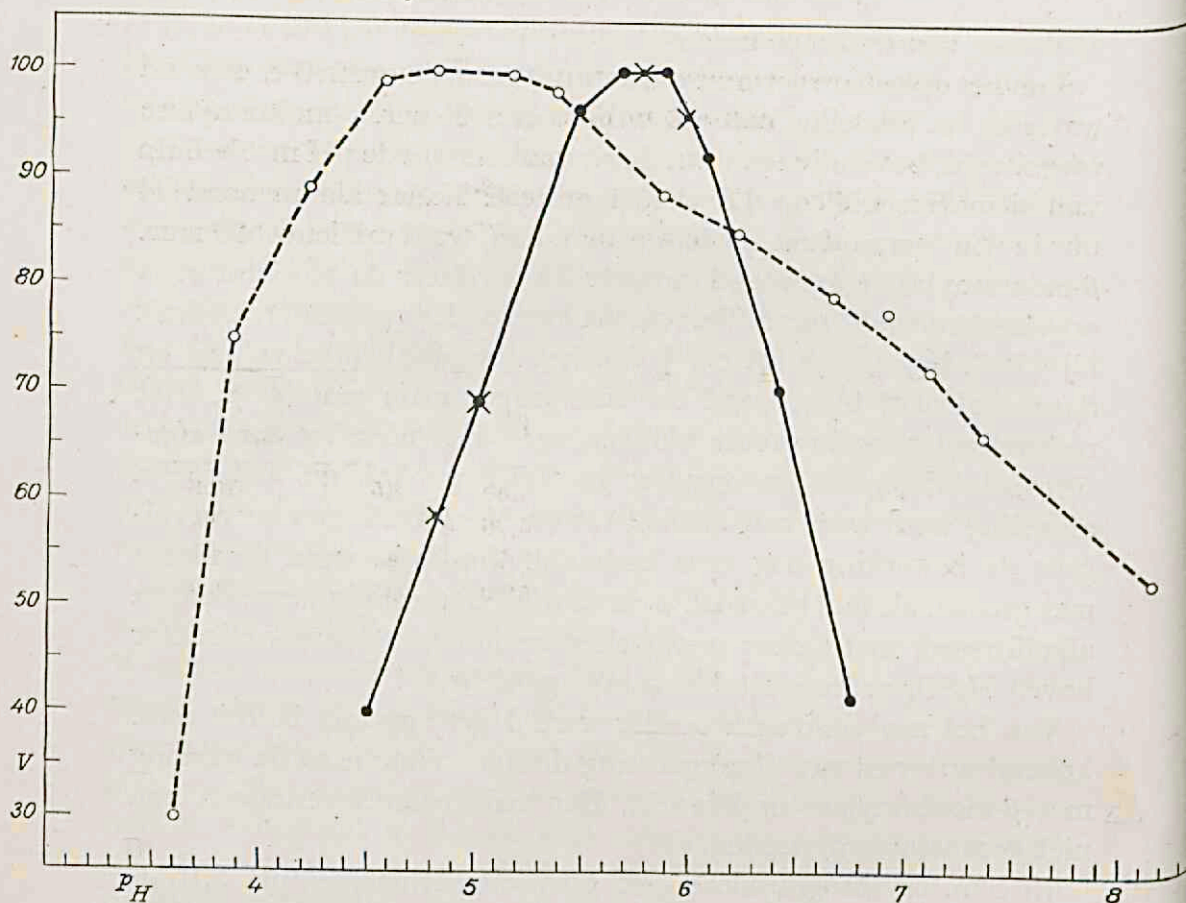


Fig. 2. pH-krommen van de beide moutamylasen. Abscis: pH; ordinaat: relatieve reactiesnelheid. ---- = β -moutamylase. — = α -moutamylase.

5 — pH-kromme van de α -moutamylase

Oriënteerende proeven leerden al spoedig, dat de reactie van de α -moutamylase geheel anders verliep, dan die van de β . Na een snel begin vond spoedig een sterke remming plaats, zoodat het uitvoeren van een lange serie bepalingen bij iederen gebruikten zuurgraad weinig zin zou hebben. Besloten werd twee bepalingen te doen, de eene 15, de andere 45 min. na het begin van de reactie.

De samenstelling van het reactiemengsel was als volgt.

50 ccm. 1 % erythrogr. opl.

25 ccm. 0,1 N. citraatmengsel.

20 ccm. aq.dest.

5 ccm. enzymopl. $\frac{1}{3000}$.

Voor iedere bepaling werd 25 ccm. gebruikt. In tabel XVI vindt men in de eerste kolom de pH, in de tweede de tijd in min. en in de derde het in den aangegeven tijd gevormde reduceerende vermogen, berekend als maltose, in mgr. per 25 ccm. van het reactiemengsel. Het voorbehoud dient gemaakt te worden, daar de mogelijkheid bestaat, dat het geconstateerde reduceerende vermogen ten deele niet van maltose, maar van intermediair optredende dextrinen afkomstig was.

TABEL XVI

pH	t min.	X mgr. malt.
4,50	15	6,8
	45	7,1
5,00	15	10,0
	45	12,3
5,45	15	11,1
	45	17,2
5,65	15	11,2
	45	17,8
5,85	15	10,5
	45	17,8
6,05	15	9,9
	45	16,4
6,40	15	7,1
	45	12,5
6,75	15	4,3
	45	4,7

TABEL XVII

pH	t min.	X mgr. malt.
4,80	45	15,5
5,00	45	18,2
5,75	45	26,6
5,95	45	25,4

Uit de in 45 min. gevormde hoeveelheden maltose is de pH-kromme berekend (fig. 2). Om de pH-krommen van de beide enzymen met elkaar te kunnen vergelijken, werd de grootste hoeveelheid

maltose gelijk aan 100 gesteld en de overige waarden van dezelfde proef in procenten van dit verhoudingsgetal uitgedrukt.

Men ziet, dat de α -moutamylase tusschen pH 5,65 en 5,85 de grootste werkzaamheid vertoont. Het gebied van optimale activiteit is smaller, dan dat van de β -moutamylase, bovendien heeft de kromme een veel steiler verloop, wat vooral aan de alkalische zijde duidelijk tot uitdrukking komt. Beide krommen komen vrij nauwkeurig met die van OHLSSON overeen, alleen schijnt de „saccharo-geen-amylase” een grotere weerstand tegen zuur gehad te hebben, dan de β -moutamylase. De overeenstemming bewijst, dat het zeer wel mogelijk is om met de methode der suikerbepaling tot hetzelfde resultaat te komen als met de jodiummethode, bij het onderzoek van de α -moutamylase. Bovendien blijkt uit het feit, dat OHLSSON *phosphaatmengsels* als bufferstof gebruikte, dat het anion der toegevoegde zouten geen noemenswaardigen invloed heeft op het verloop der pH-krommen, tenminste wat citraat en fosphaat betreft.

Uit de figuur is verder te zien, dat in het gebied van grootste werkzaamheid der β -moutamylase, de α -moutamylase slechts een betrekkelijk geringe activiteit heeft. Wanneer dus het praeparaat van α -moutamylase nog een zekere hoeveelheid β -moutamylase bevat, dan moet dit, bij gebruik van *oplosbaar zetmeel als substraat* tot uiting komen door een afwijking van de met erythrogranulose bepaalde kromme in het gebied van optimale activiteit der β -moutamylase. Om dit na te gaan, werden een viertal bepalingen gedaan met een reactiemengsel, dat in plaats van erythrogranulose 50 ccm. 1 % oplosbaar zetmeel bevatte. Voor het overige was de samenstelling als die bij de vorige proef. De bij pH 5,75 gevormde hoeveelheid maltose (zie tabel XVII) werd gelijk aan 100 gesteld en de andere hoeveelheden in verhouding daartoe berekend. De gevonden waarden zijn in de pH-kromme van de α -moutamylase met kruisjes aangegeven. Zooals men ziet vallen deze kruisjes precies op de met erythrogranulose bepaalde kromme.

Hieruit blijkt dus:

- a) dat het praeparaat van α -moutamylase geen op deze wijze aantoonbare hoeveelheid β -moutamylase bevat en
- b) dat de keuze van het substraat (*erythr.gr.* of *opl.zetmeel*) geen invloed heeft op het verloop van de pH-kromme.

Dit laatste is met het oog op de volgende proeven van belang.

6 — pH-kromme van α - β -moutamylase

Uit de ervaring van de meeste, in de inleiding genoemde, onderzoekers blijkt, dat bij de werking van „moutamylase” (α - β -moutamylase) op oplosbaar zetmeel, de werking van de β -moutamylase domineert, dwz. de pH-kromme, die zij vinden, lijkt nog het meest op die van de β -moutamylase. Laat men nu echter α - β -moutamylase werken op erythrogranulose, dan kan men verwachten, dat in dit geval de pH-kromme van de α -moutamylase te voorschijn komt.

De beteekening van een dergelijke proef ligt hierin, dat de α - β -moutamylase *niet verhit is geweest*, zoodat dus op deze wijze kan worden nagegaan, in hoeverre de eigenschappen van de α -moutamylase door de verhitting bepaald werden.

TABEL XVIII

α - β -moutamylase +
opl. zetmeel.

pH	t min.	X mgr. malt.	V rel.
3,70	30	62,8	61,9
4,60	30	99,6	98,1
5,00	30	100,3	99,0
5,30	30	101,5	100,0
5,75	30	99,5	98,0
6,00	30	98,6	97,0
6,45	30	96,8	95,4
6,85	30	91,8	90,5

TABEL XIX

α - β -moutamylase +
erythrogranulose

pH	t min.	X mgr. malt.	V rel.
4,60	30	64,1	93,5
5,00	30	67,9	99,0
5,30	30	67,8	99,0
5,75	30	68,6	100,0
6,00	30	64,3	94,0
6,45	30	47,8	69,6
6,85	30	39,5	57,5

Om een en ander te onderzoeken werd een gedeeltelijke pH-kromme bepaald van α - β -moutamylase met oplosbaar zetmeel, resp. erythrogranulose als substraat. Bij iederen zuurgraad werd slechts één suikerbepaling verricht en wel 30 min. na het begin van de reactie. De samenstelling der reactiemengsels was als volgt:

20 ccm. 2 % opl. zetmeel.	20 ccm. 2 % erythr. gr.
10 ccm. 0,1 N. citraatmengsel.	10 ccm. 0,1 N. citraatmengsel.
5 ccm. aq. dest.	10 ccm. enzymopl. $\frac{1}{1500}$.
5 ccm. enzymopl. $\frac{1}{6000}$.	

Voor iedere bepaling werden 25 ccm. van het reactiemengsel geanalyseerd. De resultaten ziet men uit de tabellen XVIII en XIX en uit fig. 3.

De als $Z\alpha\beta$ aangeduide kromme is die, welke met opl. zetmeel werd verkregen, elke bepaling is hier door een cirkeltje aangegeven. $E\alpha\beta$ is de kromme met erythrogranulose, hier wordt iedere bepaling door een kruisje voorgesteld. De dunne lijn α is de pH-kromme van de enkelvoudige α -moutamylase. Men ziet, dat de kromme $Z\alpha\beta$ een optimum vertoont bij pH 5,3 en van daar naar de alkalische zijde zeer langzaam afloopt. De kromme $E\alpha\beta$ heeft een optimum bij

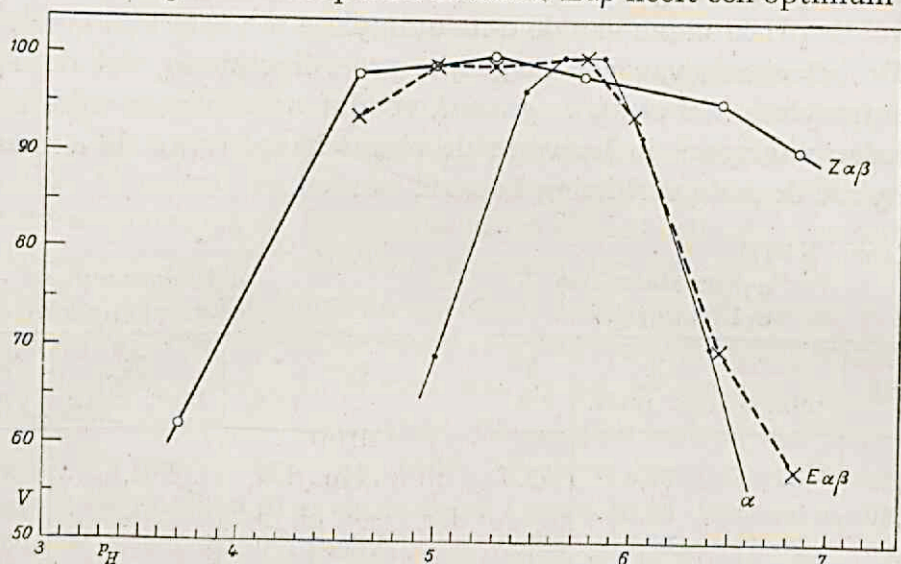


Fig. 3. pH-kromme van α - β -moutamylase met oplosbaar zetmeel ($Z\alpha\beta$) en met erythrogranulose ($E\alpha\beta$) als substraat.

pH 5,75, dus overeenkomend met dat van de α -moutamylase, en daalt van daar zeer steil, waarbij zij grootendeels met de α -kromme samenvalt. Alleen aan de zure zijde komt de $E\alpha\beta$ niet met de α -kromme overeen.

Verder blijkt uit de tabellen en uit de samenstelling van de reactiemengsels, dat met erythrogranulose als substraat een naar verhouding zeer groote hoeveelheid enzym moet worden toegevoegd, om een eenigszins aanzienlijke suikervorming te krijgen.

Er vertoonen zich bij gebruik van de twee substraten dus aanzienlijke verschillen. Deze mogen niet aan den invloed der substraten worden toegeschreven (zie de vorige proef!) en kunnen alleen daardoor verklaard worden, dat zich in de niet verhitte α - β -moutamylase de α -component reeds met haar specifieke afhankelijkheid van den zuurgraad bevindt.

De afwijking aan de zure zijde, bij het optimum der β -moutamylase, moet worden toegeschreven aan het optreden van een samenwerking tusschen de beide enzymen, dwz. de erythrogranulose wordt, na voorafgaande behandeling met α -moutamylase, ook voor de β -component aantastbaar, wat uit de volgende proeven blijkt.

40 ccm. reactiemengsel, bevattende:

20 ccm. 2 % erythrogranulose

10 ccm. 0,1 N. citraatmengsel pH 5,75

10 ccm. α -moutamylase-opl. $\frac{1}{1000}$

werden gedurende $2\frac{1}{2}$ uur in den thermostaat geplaatst. Vervolgens werd opgekookt en nagegaan hoeveel maltose zich in 10 ccm. van het mengsel bevond:

10 ccm. bevatten 32,0 mgr. maltose.

Daarna werden in een kolfje van 100 ccm. bij 10 ccm. van dit mengsel 5 ccm. β -moutamylase-opl. $\frac{1}{1000}$ gevoegd en 48 uur later de inhoud geanalyseerd:

48,0 mgr. maltose.

dus 16,0 mgr. erbij gevormd, terwijl 5 ccm. β -moutamylase-opl. uit 100 mgr. erythrogranulose, zonder voorbehandeling met α -moutamylase in denzelfden tijd slechts 2,8 mgr. maltose deden ontstaan.

Een andere dergelijke proef leverde:

met α -moutamylase na $2\frac{1}{2}$ uur 32,8 mgr. malt.

na opkoken en toevoegen van β :- 50,4 „ „

dus 17,6 mgr. erbij.

Samenvattend kunnen wij dus wel zeggen, dat bij de in dit hoofdstuk beschreven proeven *de aanwezigheid van twee verschillende amylasen in de mout definitief is komen vast te staan.*

IV

DE INVLOED VAN α -MALTOSE EN β -MALTOSE

1 — *Inleiding*

In het algemeen wordt de reactie van een enzym belemmerd door producten, die verwant zijn met het substraat van dit enzym; in de eerste plaats dus door de producten, welke bij de reactie ontstaan. Voor de moutamylase is hieromtrent een uitvoerig onderzoek ingesteld door WOHL en GLIMM ¹⁾. Zij voegden o.m. verschillende hoeveelheden maltose toe bij een mengsel van zetmeeloplossing en enzymoplossing en bepaalden dan de toeneming van de suiker. Zoo vonden zij, dat bij aanwezigheid van 15 % maltose in het reactiemengsel, geen toeneming meer te constateeren viel, dwz. de reactie werd voor 100 % geremd. Een concentratie van 10 % maltose gaf een remming van 67 %; 10 % fructose en 15 % saccharose hadden echter in het geheel geen invloed. SJOEBERG ²⁾ vond, dat de reactie van amylase uit ongekiemde gerst reeds door 0,5 % maltose verlangzaamd werd. RICHARD KUHN ³⁾ heeft de invloed van α -maltose en β -maltose op de reactiesnelheid van α -amylasen en β -amylasen onderzocht. Dit is mogelijk, doordat een verse oplossing van maltose nagenoeg uitsluitend β -maltose bevat. Laat men de oplossing staan, dan gaat een deel van de β -maltose over in α -maltose, totdat een evenwicht bereikt is. De snelheid, waarmee de omzetting plaats vindt, is vooral afhankelijk van den zuurgraad. Door alkali wordt zij zeer versneld, terwijl zij in een oplossing, zuurder dan pH 6, slechts langzaam verloopt. Men noemt deze wederzijdsche omzetting, die geconstateerd wordt uit de daarbij optredende ver-

1) A. WOHL und E. GLIMM, Biochem. Zts. 27, 349 (1910).

2) l. c. pag. 10.

3) l. c. pag. 16.

andering van het draaiings-vermogen, mutarotatie. KUHN vond nu, dat de reactie van „Takadiastase”, een α -amylase, door α - β -maltose (het evenwichtsmengsel) $2 \times$ zoo sterk geremd werd dan door eenzelfde hoeveelheid β -maltose. Bij moutamylase, volgens KUHN een β -amylase, waren de bepalingen met verschillende enzympraeparaten (extracten) niet allen met elkaar in overeenstemming. Over het algemeen remde de β -modificatie sterker dan α - β -maltose; zoo werd een extract van groenmout door β -maltose $1\frac{1}{2} \times$ zoo sterk geremd dan door het evenwichtsmengsel. Bij één extract waren de effecten nagenoeg gelijk.

De verschillende amylasen worden dus het sterkst geremd door die vorm van maltose, die zij zelf doen ontstaan. Wanneer dus, zooals uit de polarimetrische proeven van OHLSSON¹⁾ volgt, het eene moutenzym een α -amylase, het andere een β -amylase is, dan moet dit ook tot uitdrukking komen in een verschillenden invloed van β - en α - β -maltose op de reactiesnelheid. Daarom werd besloten deze invloed te bepalen.

2 — Uitvoering der proeven

Voor alle proeven werd „Maltose Kahlbaum” gebruikt. Hiervan werden oplossingen gemaakt van 2 %, 4 % en 6 % in gedest. water. Van te voren was nagegaan, hoeveel daarvoor moest worden afgewogen, daar de maltose water bevatte. Bovendien werd bij iedere proef de concentratie nauwkeurig bepaald, zoodat precies bekend was, hoeveel maltose aan het reactiemengsel werd toegevoegd. De toevoeging geschiedde voor de bepaling van den invloed van β -maltose onmiddellijk na het oplossen, voor de bepaling met α - β -maltose werd de oplossing in den thermostaat bij 40° geplaatst en minstens 24 uur daarin gelaten. Ter vergelijking werd natuurlijk ook een bepaling zonder toevoeging van maltose verricht en alle bepalingen, die tot dezelfde proef behoorden, vonden plaats onder dezelfde omstandigheden van temperatuur en zuurgraad. De gang van zaken was overigens dezelfde als bij de in de vorige hoofdstukken beschreven bepalingen van de reactiesnelheid.

1) E. OHLSSON, H. 189, 17 (1930).

TABEL XX

pH 5,15

t in uren	$\frac{1}{2}$	1	remming	
zonder maltose	12,8	25,0		
0,2 % α - β -malt.	12,5	24,5	0,3	0,5
0,2 % β -malt.	12,4	24,1	0,4	0,9

TABEL XXIII

pH 5,75

t in min.	15	r.
zonder maltose	25,6	
0,4 % α - β -malt.	23,5	2,1
0,4 % β -malt.	24,4	1,2

TABEL XXI

pH 4,90

t in uren	1	2	remming	
zonder maltose	11,1	20,2		
0,4 % α - β -malt.	10,1	19,2	1,0	1,0
0,4 % β -malt.	10,2	18,7	0,9	1,5

TABEL XXIV

pH 5,75

t in min.	15	r.
zonder maltose	29,7	
0,4 % α - β -malt.	26,4	3,3
0,4 % β -malt.	28,0	1,7

TABEL XXII

pH 5,00

t in uren	$1\frac{1}{2}$	$2\frac{1}{2}$	remming	
zonder maltose	32,2	46,9		
0,6 % α - β -malt.	29,7	44,1	2,5	2,8
0,6 % β -malt.	29,1	43,4	3,1	3,5

In de tabellen vindt men het *verschil* tusschen de bepaalde hoeveelheid maltose en de van te voren toegevoegde hoeveelheid, uitgedrukt in mgr. per analyseproefje (10 ccm., behalve bij de proef, vermeld in tabel XX, waarbij 25 ccm genomen werd). De samenstelling van het reactiemengsel was bij alle bepalingen als volgt:

50 ccm. 2 % opl. zetmeel

25 ccm. 0,1 N. citraatmengsel

15 ccm. aq.dest., of 5 ccm. aq.dest. en 10 ccm. maltoseopl. 2 %, 4 % of 6 %.

10 ccm. enzymopl. $\frac{1}{1000}$ (tabel XXII: $\frac{1}{500}$).

De tabellen XX, XXI en XXII geven de proeven met β -moutamylase; XXIII en XXIV die met α -moutamylase.

Men ziet, dat over het algemeen de reactie van de β -moutamylase sterker geremd wordt door β -maltose, dan door α - β -maltose; in enkele gevallen komt het effect overeen met het door KUHN gevonden verschil bij een extract van groenmout. Het is echter niet bij alle bepalingen hetzelfde.

Bij de α -moutamylase daarentegen oefent de α - β -maltose een duidelijk sterkere remming uit dan de β -maltose en wel zijn de beide bepalingen niet alleen onderling in goede overeenstemming, maar bovendien komen zij vrij nauwkeurig overeen met het door KUHN gevonden verschil bij „Takadiastase”, hetgeen er dus wel op wijst, dat wij hier met een α -amylase te doen hebben.

Het is nog niet gelukt α -maltose in zuiveren toestand in handen te krijgen. HUDSON en YANOWSKY ¹⁾ echter hebben vastgesteld, dat het evenwichtsmengsel van maltose is samengesteld uit 64 % β -maltose tegen 36 % α -maltose. Dit stelt ons in staat te berekenen, hoe groot het aandeel geweest is, dat de α -maltose in het evenwichtsmengsel aan de remming gehad heeft en welke remming wij gekregen zouden hebben, indien wij met enkel α -maltose hadden kunnen werken.

De resultaten van deze berekeningen vindt men in de tabellen XXV en XXVI; de verschillen komen hier, zooals men ziet, duidelijker te voorschijn.

TABEL XXV					TABEL XXVI		
β -moutamylase					α -moutamylase		
α -maltose	0	0,1	1,4	1,6	α -maltose	6,1	3,7
β -maltose	0,9	1,5	3,1	3,5	β -maltose	1,7	1,2

Samenvattend kunnen wij dus zeggen, dat deze proeven:

- een nieuw argument vormen voor de ongelijksoortigheid der beide amylasen en*
- een bevestiging zijn van de polarimetrische onderzoeken van OHLSSON.*

1) C. S. HUDSON and E. YANOWSKY, J. Am. Chem. Soc. **39**, 1031 (1917).

INVLOED VAN DE ENZYMCONCENTRATIE OP DE REACTIESNELHEID EN DE GRENS VAN DE AFBRAAK DER BEIDE MOUTAMYLASEN

1 — *Proeven met β -moutamylase*

Het feit, dat mijn praeparaten van α - en β -moutamylase als enkelvoudig mochten worden beschouwd, stelde mij in staat de werking van de beide enzymen *op hetzelfde substraat* — oplosbaar zetmeel — en *met behulp van dezelfde methode* voor de bepaling van de activiteit te bestudeeren. Daartoe werd de reactiesnelheid en de grens van de afbraak bepaald bij verschillende enzymconcentraties, terwijl de concentratie van het zetmeel steeds dezelfde bleef, n.l. 1 %. Op deze manier konden de eigenschappen der beide amylasen het duidelijkst tot uitdrukking komen.

Reeds in hoofdstuk III zijn proeven vermeld, die bewijzen, dat de grens van de zetmeelafbraak, veroorzaakt door β -moutamylase, niet verschuift bij langdurige inwerking of bij toevoegen van versch enzym, terwijl het restproduct, bevrijd van maltose, nagenoeg geen werking meer met dit enzym vertoont. Hieruit blijkt, dat wij dus *niet met een evenwichtstoestand*, maar met *een werkelijke grens van de afbraak* te doen hebben. Bij een van de proeven nu, die enkel dienden om de grens van de afbraak nauwkeurig te bepalen, werd gebruik gemaakt van een zetmeeloplossing van 2 %, die gedurende eenigen tijd in de koude gestaan had en een melkwit uiterlijk vertoonde, terwijl ook de viscositeit merkbaar groter geworden was. Klaarblijkelijk was gelatineering ingetreden, zonder dat zich echter een vaste massa had gevormd, aangezien daarvoor de concentratie te gering was. Deze zetmeel-oplossing nu gaf met β -moutamylase in een etmaal slechts 52,2 % maltose. In drie etmalen werd 53,5 %

gevormd, terwijl 6 etmalen na toevoeging van het enzym 55,6 % maltose ontstaan was. De reactie werd dus tegen het eind aanzienlijk verlangzaamd. Bij verwarming van de zetmeeloplossing aan een opstijgenden koeler om verandering van de concentratie te voorkomen, begon de troebelheid bij 60° te verdwijnen. Bij 70° was de vloeistof weer geheel helder geworden. Na afkoeling werd opnieuw de grens van de afbraak bepaald en 60,9 % gevonden in 24 uur, dus weer nagenoeg het oorspronkelijke percentage van 62 %. Het was nu de vraag, in hoeverre dit percentage beïnvloed zou kunnen zijn door onvolkomen peptisatie van het zetmeel, dwz. of niet een beter „oplosbaar” zetmeel verder, wellicht voor 100 %, door β -moutamylase zou kunnen worden gehydrolyseerd. Immers het was wel gebleken uit het gedrag van de gegelatineerde zetmeeloplossing, dat om aan een gevonden afbraakgrens eenige beteekenis te mogen toekennen, men er zeker van moet zijn, dat de kolloïde toestand van het substraat geen rol heeft gespeeld.

Om nu het gemakkelijkst-oplosbare deel van het zetmeel in handen te krijgen schudde ik ca. 20 gr. van het praeparaat met 300 ccm. water van 60° C. gedurende ca. 20 min. Daarna werd van het niet in oplossing gegane deel (verreweg het grootste deel) afgesigtreerd en het filtraat $\frac{1}{2}$ uur langzaam gekookt. Het stelde een glasheldere oplossing voor, welke ook na dagen bij kamertemperatuur te hebben gestaan nauwelijks eenige opalescentie vertoonde. Toch bevatte zij, blijkens analyse (hydrolyse met 2½ % HCl op de beschreven wijze) ruim 0,8 % amyllum. Hiermee werd nu de afbraakgrens bepaald.

Reactiemengsel:

50 ccm. zetmeelopl.

25 ccm. 0,1 N. citraatmengsel pH 5,15.

15 ccm. aq. dest.

10 ccm. enzymopl. $\frac{1}{1000}$

25 ccm. van het reactiemengsel bevatten vóór de hydrolyse:

101,6 mgr. amyllum, wat overeenkomt met 107,5 mgr. maltose. na 20 uur werd gevonden: 68,7 mgr. maltose 64 % v. d. theorie.

„ 68 „ „ „ 68,2 „ „ 63,5 % „

Er heeft dus slechts een geringe verhooging van de afbraakgrens plaats.

Vervolgens ging ik er toe over eenige nieuwe praeparaten van

oplosbaar zetmeel te maken uit denzelfden voorraad aardappelmeel, waaruit het eerste praeparaat bereid was. Het verschil met het eerste praeparaat bestond hierin, dat het aardappelmeel i.p.v. 10 dagen, 12, resp. 14 dagen met $7\frac{1}{2}$ % zoutzuur bij kamertemperatuur behandeld werd ¹⁾. Beide praeparaten bezaten een gehalte aan zuiver amyllum van 89 % en vertoonden dezelfde eigenreductie als het eerste. Hun oplossingen waren, tenminste kort na de bereiding, zeer helder. *Een volledige oplossing van beide praeparaten werd door β -moutamylase voor 64 % gehydrolyseerd.*

Ik meen daarom te mogen zeggen, *dat dit percentage de werkelijke grensafbraak van de β -moutamylase voorstelt.*

Bij de in het vervolg te beschrijven proeven is steeds het tweede, 12 dagen behandelde, zetmeelpraeparaat gebruikt.

De tabellen XXVII t/m XXX (zie pag. 55) en fig. 4 geven een overzicht van de proeven met verschillende concentraties β -moutamylase, die alle bij pH 5,00 en 40° C. werden uitgevoerd, terwijl de concentratie van het zetmeel in het reactiemengsel 1 % bedroeg. De getallen bij de krommen en rechts boven de tabellen geven de relatieve hoeveelheden β -moutamylase aan, „1” beteekent daarbij, dat 100 ccm. reactiemengsel 5 ccm. enzymoplossing $\frac{1}{1000}$ bevatten. In de eerste kolom vindt men weer de tijd in uren, in de tweede de hoeveelheid maltose in mgr. per 10 ccm., in de derde kolom de hoeveelheid maltose in % van de theorie. V, k' en k in de vierde, vijfde en zesde kolom stellen resp. voor de *reactiesnelheid* in mgr. maltose per uur, de *reactiesnelheidsconstante* van de monomoleculaire reactie met $a = 64$ % en dezelfde constante voor $a = 100$ % ²⁾.

In de eerste plaats blijkt dat, *onafhankelijk van de enzymconcentratie*, de reactie na korteren of langeren tijd bij de vorming van ca. 64 % van de theoretisch mogelijke hoeveelheid maltose stopt.

Verder, *dat de beginsnelheid van de reactie nagenoeg evenredig is met de enzymconcentratie* en

ten derde, *dat bij een geringe enzymconcentratie, de reactie een nagenoeg rechtlijnig verloop heeft.*

De enzymconcentratie „2” komt overeen met die, welke bij de bepaling van de pH-kromme gebruikt was. Vergelijkt men tabel

1) Zie ook pag. 25.

2) Zie ook pag. 40.

TABEL XXVII

1

t uren	X mgr. malt.	% v. d. theorie	V x/t	k'. 10 ⁴ a = 64	k. 10 ⁴ a = 100
1	5,3	5,0	5,3	35	22,0
3	16,4	15,5	5,5	40	24,3
4	21,3	20,2	5,3	41	24,5
5	25,2	24,9	5,0	43	24,9
8	37,3	35,4	4,7		
24	62,6	59,4			
48	67,2	63,7			

TABEL XXVIII

2

t uren	X mgr. malt.	% v. d. theorie	V x/t	k'. 10 ⁴ a = 64	k. 10 ⁴ a = 100
1	12,0	11,4	12,0	85	52,5
2	22,2	21,0	11,1	86	51,3
4	40,4	38,3	10,1	99	52,5
5	46,9	44,5	9,4	103	51,1
6	51,5	48,8	8,1		48,5
7	55,9	53,0			
24	67,1	63,5			

TABEL XXIX

5

t uren	X mgr. malt.	% v. d. theorie	V x/t	k'. 10 ⁴ a = 64	k. 10 ⁴ a = 100
1	28,6	27,1	28,6	239	137,0
2	48,7	46,2	24,3	278	134,5
3	60,5	57,3	20,2	327	123,4
5	66,0	62,6	13,2		
6	66,8	63,3			
8	66,8	63,3			
24	68,5	64,8			

TABEL XXX

10

t uren	X mgr. malt.	% v. d. theorie	V x/t
1	51,0	48,3	51,0
2	64,1	60,7	32,0
3	66,4	63,0	22,1
5	66,8	63,3	
24	68,3	64,7	

XXVIII met tabel XV op pag. 38, dan ziet men, dat in beide gevallen de k vrijwel constant is. Bij de conc. „1” vertoont zij een stijging, bij de conc. „5” een daling. De k' , welke op de juiste wijze berekend is, n.l. door 64 % van de aanvankelijk aanwezige hoeveelheid zetmeel als beginconcentratie aan te nemen, vertoont in alle

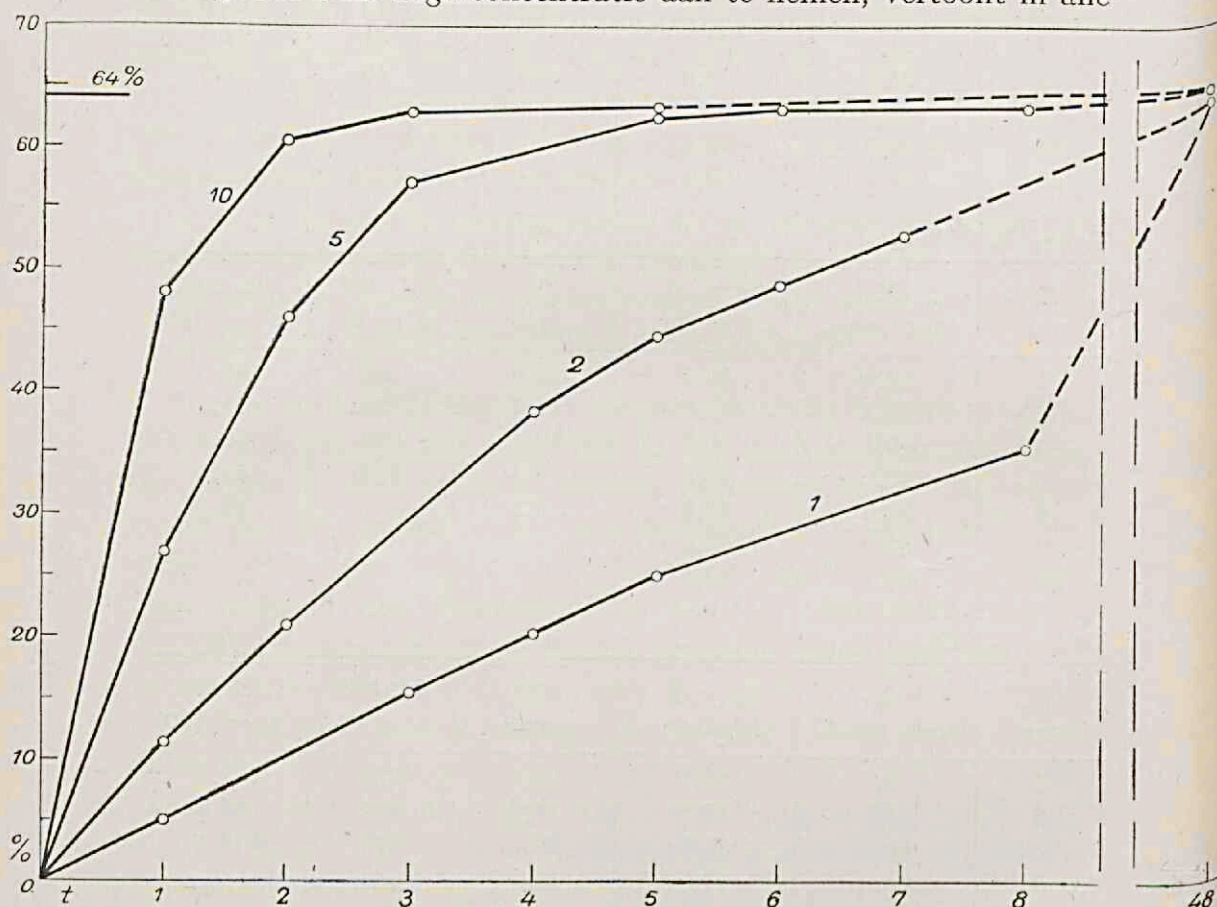


Fig. 4. Verloop van de reactie van β -moutamylase in verschillende concentraties. De cijfers bij de krommen geven de relatieve hoeveelheden enzym aan. Abscis: tijd in uren; ordinaat: maltose in % v. d. theorie.

gevallen een stijging, dwz. de reactie heeft niet een logarithmisch verloop.

De β -moutamylase vertoont, in tegenstelling tot wat algemeen voor de „moutamylase” gevonden is ¹⁾, een zoodanige regelmatig-

1) Zie J. B. S. HALDANE, Enzymes, London 1930, pag. 140, die als „abnormale verschijnselen” opgeeft: „the dependence of the endpoint on the amount of amylase, and the lack of proportionality between quantity of amylase and reaction velocity”.

heid in haar gedrag, dat het, naar mijn meening, zin heeft om de vraag te stellen hoe wij ons de werking van dit enzym moeten denken.

Aangenomen wordt, dat zich bij alle enzymwerkingen tusschen enzym en substraat een verbinding vormt en dat, onder overigens gelijkblijvende omstandigheden, de per tijdseenheid gevormde hoeveelheid reactieproduct, dus de *reactiesnelheid*, evenredig is met de concentratie *van deze verbinding*. Er kunnen zich dan in hoofdzaak twee gevallen voordoen ¹⁾.

a) Wanneer weinig enzym in staat is veel substraat te binden en de substraat-concentratie is gering, dan zal de hoeveelheid enzym-substraat-verbinding *evenredig zijn met de concentratie van het substraat*. Daar deze gedurende de reactie vermindert, krijgen we in dit geval dus een *logarithmisch verloop*.

b) Het enzym bindt zoo weinig substraat of de substraat-concentratie is zoo hoog, dat er tot kort voor het einde van de reactie steeds overmaat substraat aanwezig is. In dit geval is de hoeveelheid enzym-substraat-verbinding *evenredig met de enzymconcentratie*; wanneer deze niet verandert heeft de reactie dus een *rechtlijnig verloop*.

De zaak wordt echter gecompliceerder wanneer de reactieproducten een remmende werking uitoefenen, wat meestal het geval is. Dan zal zoowel de reactiesnelheid V als de k van de monomoleculaire reactie een *daling* vertoonen. Een stijging van de reactiesnelheidskonstante is onder geen omstandigheden te verwachten.

Beschouwen we nu de werking van de β -moutamylase, dan zal duidelijk zijn, dat we hier te doen hebben met het onder *b* vermelde geval. De reactiesnelheid daalt door de remmende werking van de maltose. Hoe verder wij ons van de grens van afbraak bevinden en hoe langzamer de reactie plaats vindt, des te meer benadert haar verloop de rechtlijnigheid. Wij hebben dit reeds gezien in de tabellen I—XV, waar de rechtlijnigheid steeds duidelijker te voorschijn komt, naarmate wij in meer alkalisch milieu werken, dwz. naarmate de reactie langzamer gaat.

1) Ibidem, pag. 74.

2 — *Proeven met α -moutamylase*

In fig. 5 en in de tabellen XXXI t/m XXXVII is de werking van verschillende hoeveelheden α -moutamylase op een 1 % zetmeeloplossing bij pH 5,75 en 40° C. weergegeven. Ook hier worden door de cijfers boven de tabellen en bij de krommen de relatieve enzymconcentraties aangeduid, „1” beteekent in dit geval, dat

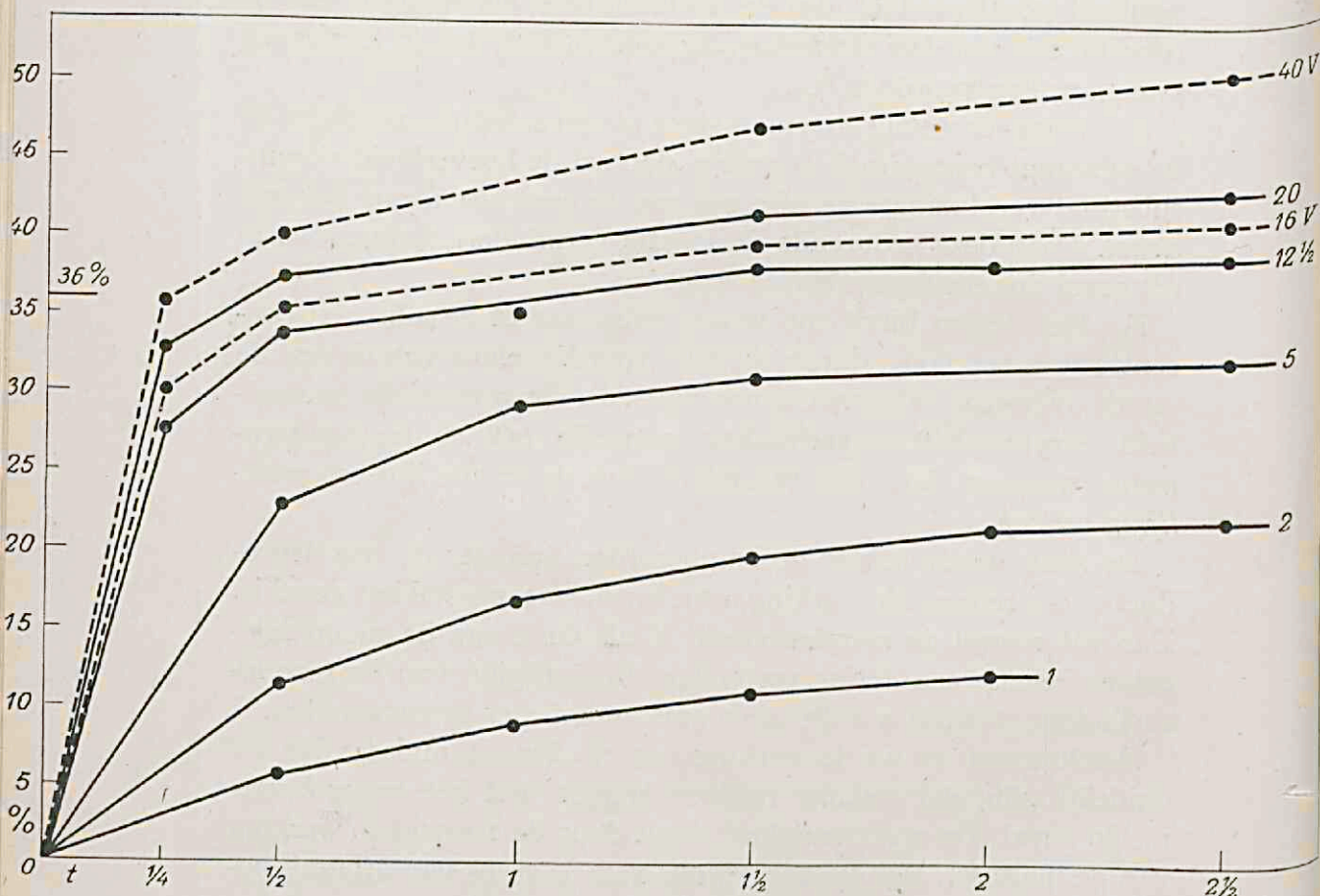


Fig. 5. Verloop van de reactie van α -moutamylase in verschillende concentraties. Abscis: tijd in uren; ordinaat: maltose in % v. d. theorie. Zie voor nadere verklaringen den tekst.

zich in 200 ccm. reactiemengsel 5 ccm. enzymoplossing $1/3000$ bevonden. Bij iedere bepaling werden 25 ccm. geanalyseerd.

Van de regelmatigheden, die de β -moutamylase vertoont, vinden wij hier niet veel terug. Alleen bij geringe hoeveelheden enzym is de beginsnelheid van de reactie evenredig met de enzymconcen-

TABEL XXXI

1

t	X	%
uren	mgr. malt.	v. d. th.
$\frac{1}{2}$	15,0	5,7
1	23,8	9,0
$1\frac{1}{2}$	28,3	10,7
2	32,2	12,2
15	37,2	14,1
40	37,4	14,2

TABEL XXXIII

5

t	X	%
uren	mgr. malt.	v. d. th.
$\frac{1}{2}$	60,7	23,0
1	77,0	29,2
$1\frac{1}{2}$	81,9	31,0
$2\frac{1}{2}$	84,7	32,1
18	87,0	33,0

TABEL XXXV

20

t	X	%
uren	mgr. malt.	v. d. th.
$\frac{1}{4}$	86,9	33,0
$\frac{1}{2}$	98,9	37,4
$1\frac{1}{2}$	109,3	41,3
$2\frac{1}{2}$	113,7	43,0
60	114,2	43,3

TABEL XXXVII

40v.

t	X	%
uren	mgr. malt.	v. d. th.
$\frac{1}{4}$	94,4	35,8
$\frac{1}{2}$	106,2	40,2
$1\frac{1}{2}$	124,1	47,0
$2\frac{1}{2}$	133,2 *)	50,5
36	198,3 *)	75,2

TABEL XXXII

2

t	X	%
uren	mgr. malt.	v. d. th.
$\frac{1}{2}$	30,5	11,5
1	44,6	17,0
$1\frac{1}{2}$	52,1	19,7
2	56,3	21,3
$2\frac{1}{2}$	58,0	22,0
21	62,3	23,6

TABEL XXXIV

12 $\frac{1}{2}$

t	X	%
uren	mgr. malt.	v. d. th.
$\frac{1}{4}$	73,2	27,7
$\frac{1}{2}$	89,4	33,8
1	93,2	35,3
$1\frac{1}{2}$	99,5	37,7
2	101,0	38,2
$2\frac{1}{2}$	102,4	38,8
20	105,2	39,9

TABEL XXXVI

16v.

t	X	%
uren	mgr. malt.	v. d. th.
$\frac{1}{4}$	79,6	30,2
$\frac{1}{2}$	93,4	35,4
$1\frac{1}{2}$	104,6	39,6
$2\frac{1}{2}$	108,1	41,0
60	151,5 *)	57,5

*) Bepaald met 10 ccm. en de gevonden hoeveelheid vermenigvuldigd met 2,5.

tratie. Bij de concentratie „5” echter is de gevormde hoeveelheid maltose naar verhouding reeds te gering (n.l. 4). Wanneer wij de bepalingen „16v” en „40v” nog even buiten beschouwing laten, dan wekt het verloop der hydrolyse den indruk, dat het bij de werking der β -moutamylase overblijvende deel van het zetmeel (36 %), door de α -moutamylase wordt omgezet. Die indruk wordt nog versterkt door het feit, dat de *jodiumreactie* bij de werking der α -moutamylase *vrij snel verdwijnt* (n.l. bij ca. 15—20 % maltose) terwijl zij *in het geheel niet verdwijnt* bij de werking der β -moutamylase. De grens van de afbraak is echter, zooals uit de tabellen blijkt, afhankelijk van de hoeveelheid amylase en blijft bij geringe enzymconcentraties beneden 36 %. Ook bij verhooging van de enzymconcentratie komt geen scherpe grens te voorschijn, hoewel de maltosevorming klaarblijkelijk slechts met moeite de 36 % overschrijdt.

Aanvankelijk veronderstelde ik, dat een zeer gering gehalte van het praeparaat aan β -moutamylase, niet aantoonbaar op de in hoofdstuk III beschreven wijze, de overschrijding van de verwachte grens veroorzaakte. Een oplossing van (reeds door verhitting verkregen) α -moutamylase $1/500$ werd daarom gedurende 15 min. op 70° C. verhit, vervolgens snel afgekoeld en gefiltreerd.

Met deze pas verhitte oplossing werden nu eenige bepalingen gedaan, waarbij zich 10 ccm. resp. 25 ccm. bevonden in 100 ccm. reactiemengsel ¹⁾. De zoo gevonden krommen, in fig. 4 gestippeld, sluiten zich goed bij de andere aan, tenminste gedurende de eerste uren van de reactie. Van het optreden van een scherpe grens is geen sprake, zoodat de veronderstelling van een verontreiniging met β -moutamylase dus niet juist blijkt te zijn. Uit de ligging van de kromme, bepaald met 10 ccm. enzymoplossing werd de relatieve concentratie op „16” geschat, de „v” geeft aan, dat hier met de verhitte enzymoplossing gewerkt is. Voor de andere bepaling volgt daaruit een relatieve concentratie van „40v”.

Bij langere inwerking echter, vertoont het gedrag van de ver-

1) De lezer zal wellicht opmerken, dat aan 100 ccm. reactiemengsel slechts 3×25 ccm. te ontnemen zijn, terwijl de tabellen 5 suikerbepalingen aangeven. Deze proeven werden echter $2 \times$ onder gelijke omstandigheden uitgevoerd, waarbij telkens, ter contrôle, twee bepalingen op denzelfden tijd vielen.

hitte enzymoplossing een merkwaardig verschil met dat van de niet verhitte. Terwijl met de laatstgenoemde na 2—3 uur vrijwel geen verdere maltosevorming meer optreedt, gaat met de verhitte oplossing de reactie verder en wel, zooals uit de tabellen XXXVI en XXXVII blijkt, met de enzymconcentratie „16v” in 60 uur tot 57,5 %, met de concentratie „40v” in 36 uur zelfs tot **75,2** %. Bovendien werd bij de bepaling „16v” na $2\frac{1}{2}$ uur, dus nadat 41 % maltose gevormd waren, bij 10 ccm. van het reactiemengsel 5 ccm. van de verhitte enzymoplossing gevoegd en na 40 uur de gevormde suiker bepaald: 82,9 mgr. maltose = **78,5** % van de theorie.

Hieruit blijkt dus, dat de α -moutamylase, dus die component, welke in de literatuur „dextrinevormend” of „zetmeeloplossend” genoemd wordt, wanneer zij maar in groote hoeveelheid aanwezig is en door verhitting geactiveerd, *in staat is meer maltose te vormen, dan de β -moutamylase*, die altijd als het „suikervormende” enzym beschreven wordt. Toch blijkt ook bij gebruik van de concentratie „40v” een aanzienlijke remming van de reactie in de nabijheid van 36 % op te treden. In het volgende hoofdstuk zal getracht worden van deze verschijnselen een verklaring te geven.

Het ligt voor de hand, de gevonden activeering van de α -moutamylase door verhitting, in verband te brengen met OHLSSON's ontdekking van een stof in de mout, die de werking van dit enzym belemmert *en die door verhitting vernietigd wordt* ¹⁾. Dit verklaart ook, waarom bij gebruik van moutextract zonder meer, de werking van de β -moutamylase zoo sterk op den voorgrond treedt.

3 — *Proeven met α - β -moutamylase*

Het is mij niet gelukt, door gelijktijdige of achtereenvolgende werking der beide amylasen, het zetmeel voor 100 % in maltose om te zetten. In alle gevallen kwam de reactie tot stilstand bij de vorming van 78—80 % maltose. Dit was ook, zooals wij zoo juist gezien hebben, de grootste opbrengst, welke door de geactiveerde α -moutamylase alléén verkregen kon worden. Door de meeste onderzoekers is deze gedeeltelijke versuikering geconstateerd. KUHN (l.c.) vermeldt echter, dat sommige moutsoorten, na langdurige extractie, een enzym leveren, dat een volkomen versuikering tot

1) Zie pag. 31.

stand brengt. PRINGSHEIM¹⁾ heeft gevonden, dat de maltosevorming eveneens verder gaat dan 78 %, wanneer men aan het reactiemengsel bepaalde afbraakprodukten van eiwitstoffen toevoegt, die men krijgen kan door autolyse van gist of door kippen-eiwit met pepsine te behandelen. Hij noemt deze stof, of verzameling van stoffen, „komplement”. Door KUHN en door SJOEBERG²⁾ is het bestaan van dit „komplement” bevestigd; echter schijnen niet alle gistsoorten het te bevatten. Daar ik vermoedde, dat alleen de α -moutamylase door het „komplement” zou worden beïnvloed, heb ik getracht het te bereiden, wat mij echter niet is mogen gelukken. Noch versche bakkersgist, noch versche biergist (afkomstig van de Brouwerij d’Oranjeboom te Rotterdam) bleken het te bevatten. Wel vond een verhooging van het reduceerend vermogen plaats; die moest echter toegeschreven worden aan de aanwezigheid van maltase in het gistautolysaat, daar na verhitting op 75° gedurende eenige minuten het effect verdwenen was, terwijl het „komplement” thermostabiel heet te zijn. Ook kippen-eiwit met pepsine behandeld bij pH 2,0 en 30° C. gedurende 24 uur gaf een verhooging van het reduceerend vermogen, dit bleek hier te moeten worden geweten aan een eigenreductie van het toegevoegde praeparaat. Bracht ik deze in rekening, dan bleef voor de werking van de α - β -moutamylase niet meer dan 78 % over.³⁾

1) H. PRINGSHEIM u. A. BEISER, Biochem. Zts. **148**, 336 (1924).

H. PRINGSHEIM u. G. OTTO, Biochem. Zts. **173**, 399 (1926).

H. PRINGSHEIM u. M. WINTER, Biochem. Zts. **177**, 406 (1926).

2) K. SJÖBERG, H. **159**, 468 (1925), zie ook L. DE HOOP u. J. A. VAN LAER, Biochem. Zts. **155**, 235 (1925).

3) H. PRINGSHEIM, H. BORCHARD und H. HUPFER, Biochem. Zts. **238**, 476, (1931) vermelden, dat *glutathion* dezelfde activeerende werking uitoefent als het „komplement” (noot bij de corr.).

VI

VERKLARING DER AFBRAAKGRENZEN PROEVEN MET GLYCOGEEN

1 — *Verklaring der afbraakgrenzen*

Wij hebben dus gezien, dat de beide moutamylasen, in den vorm van enkelvoudige praeparaten, een zeer verschillende gevoeligheid voor den zuurgraad van het milieu bezitten; dat de werking der β -moutamylase het sterkst door β -maltose, die der α -moutamylase het sterkst door α -maltose geremd wordt en dat een volkomen oplosbaar (peptiseerbaar) zetmeel door de β -moutamylase voor 64 % wordt gehydrolyseerd, waarbij een scherpe grens van afbraak optreedt, terwijl bij de werking van de α -moutamylase 36 % van het zetmeel met groote snelheid wordt omgezet, de rest veel langzamer. Daarnaast mogen de volgende feiten naar voren worden gebracht. Door HUDSON en YANOWSKY ¹⁾ is aangetoond, dat zich in de evenwichtsoptelling van maltose 64 % β -maltose naast 36 % α -maltose bevinden. Verder is uit het specifieke draaiingsvermogen van α -glucose ($[\alpha]_D = + 109,6^\circ$) en β -glucose ($[\alpha]_D = + 20,5^\circ$) en uit dat van het evenwichtsmengsel ($[\alpha]_D = + 52,3^\circ$) te berekenen ²⁾, dat in een oplossing van glucose na afloop der mutarotatie 64 % β -glucose naast 36 % α -glucose voorkomen.

De merkwaardige overeenstemming tusschen de afbraakgrenzen der beide moutamylasen en de samenstelling van het evenwichtsmengsel van maltose en glucose, beiden typische afbraakproducten van het zetmeel, heeft mij nu tot de overtuiging gebracht, *dat het zetmeel, tenminste in de door mij gebruikte oplossing, uit een even-*

1) l. c. pag. 51.

2) Deze getallen zijn overgenomen uit P. KARRER, Lehrbuch der organischen Chemie, Leipzig (1928) pag. 320.

wichtsmengsel van twee, chemisch verschillende componenten bestaat, die ik, naar de amylasen, waardoor zij worden aangetast, α -zetmeel en β -zetmeel zou willen noemen. In het mengsel komt dan naast 64 % β -zetmeel, 36 % α -zetmeel voor. Het β -zetmeel wordt alleen (of tenminste in de eerste plaats) door de β -moutamylase gehydrolyseerd, daarbij ontstaat de maltose in eerste instantie als β -maltose. Het rest-product van de werking van β -moutamylase, de stof, die WIJSMAN erythrogranulose heeft genoemd, is dus α -zetmeel; dit wordt alleen door de α -moutamylase aangetast, waarbij de maltose in eerste instantie als α -maltose ontstaat. Uit het feit, dat een scherpe grens van afbraak optreedt en dat het α -zetmeel op zichzelf door β -moutamylase slechts weinig wordt aangetast, volgt, dat deze component onder de omstandigheden waarbij gewerkt werd, slechts voor een zeer gering deel in β -zetmeel overgaat. Deze moeilijke omzetting, in tegenstelling tot wat wij bij α -maltose en α -glucose vinden, wordt wel begrijpelijk wanneer wij bedenken, dat wij hier niet met betrekkelijk kleine moleculen in ware oplossing, maar met groot-moleculaire verbindingen in kolloide oplossing te maken hebben. Het schijnt overigens, dat een gedeeltelijke omzetting plaats vindt tijdens de inwerking van α -moutamylase, gezien het feit, dat daarna ook de β -moutamylase een zekere werking vertoont¹⁾. Hoe moeten wij nu de werking van α -moutamylase op oplosbaar zetmeel verklaren? Een mogelijke verklaring is deze, dat de nawerking, die dit enzym vertoont, wanneer 36 % zijn omgezet, het gevolg is van een nalevering van substraat, dwz. van een omzetting van het β -zetmeel in α -zetmeel, wanneer het evenwicht verbroken is. Een andere mogelijkheid is, dat de α -amylase in staat is ook β -zetmeel langzaam te hydrolyseeren.

Wij komen dus tot de voorstelling, dat met de twee moutamylasen, of meer in het algemeen, met de twee typen van amylasen, twee vormen van het zetmeel correspondeeren en dat de verschillende specificiteit van deze beide typen van amylasen dus niet alleen daarin bestaat, dat zij verschillende stoffen *vormen* (α -maltose en β -maltose), maar ook hierin, dat zij verschillende stoffen *afbreken* (α -zetmeel en β -zetmeel). Deze voorstelling nu, is op de volgende wijze uit te breiden.

1) Zie pag. 47.

KUHN vindt, dat pankreas-amylase (als vertegenwoordiger van de dierlijke amylasen) en Aspergillus-amylase (als vertegenwoordiger van de amylasen uit schimmels) tot de α -amylasen behooren. Moutamylase (als vertegenwoordiger van de amylasen uit de groene plant) bestaat uit een mengsel van α - en β -amylase. Daar nu de amylasen niet alleen hydrolyseeren, maar natuurlijk ook bij de synthese der polysacchariden werkzaam zijn, ligt het voor de hand om aan te nemen, *dat in het dierlijk lichaam en in de schimmels alleen α -zetmeel kan worden gevormd*. Daar deze component moeilijk in de andere overgaat, kunnen wij verwachten, dat wij haar als zoodanig zullen aantreffen. Inderdaad komt nu in het dierlijk lichaam en in vele Fungi een polysaccharide voor, het „dierlijk zetmeel” of glycogeen, waarvan bekend is, dat het in zeer nauwe verwantschap tot het zetmeel staat, zonder daarmee in alle opzichten identiek te zijn.

Daardoor is de mogelijkheid gegeven om onze voorstelling te contrôleeren. Immers is zij juist, *dan moet het α -zetmeel (de erythrogranulose) identiek zijn met glycogeen*. Om dit na te gaan heb ik eenige vergelijkende proeven gedaan met oplosbaar zetmeel, erythrogranulose en glycogeen, waarbij het gedrag van deze drie stoffen tenopzichte van de beide moutamylasen werd vergeleken.

TABEL XXXVIII

 α -moutamylase

substraat	t uren	X mgr. malt.
glycogeen	$\frac{1}{2}$	22,0
	1	27,3
	$1\frac{1}{2}$	29,3
er. granulose	$\frac{1}{2}$	30,3
	1	32,5
	$1\frac{1}{2}$	33,8
opl. zetmeel	$\frac{1}{2}$	46,6
	1	49,0
	$1\frac{1}{2}$	50,0

TABEL XXXIX

 β -moutamylase

substraat	t uren	X mgr. malt.
opl. zetmeel	1	24,1
	2	43,5
	3	57,5
er. granulose	1	1,6
	2	1,8
	3	2,1
glycogeen	1	2,9
	2	5,1
	3	7,1

2 — Proeven met glycogeen.

Gebruikt werd „Glycogen puriss. Merck”, dat als zeer zuiver bekend staat. Samenstelling van het reactiemengsel:

50 ccm. 1 % opl. zetmeel, erythr. granulose of glycogeen.

25 ccm. 0,1 N. citraatmengsel pH 5,75 of pH 5,00.

15 ccm. aq. dest.

10 ccm. enzymopl. $\frac{1}{1000}$

De bepalingen met β -moutamylase werden bij pH 5,00, die met

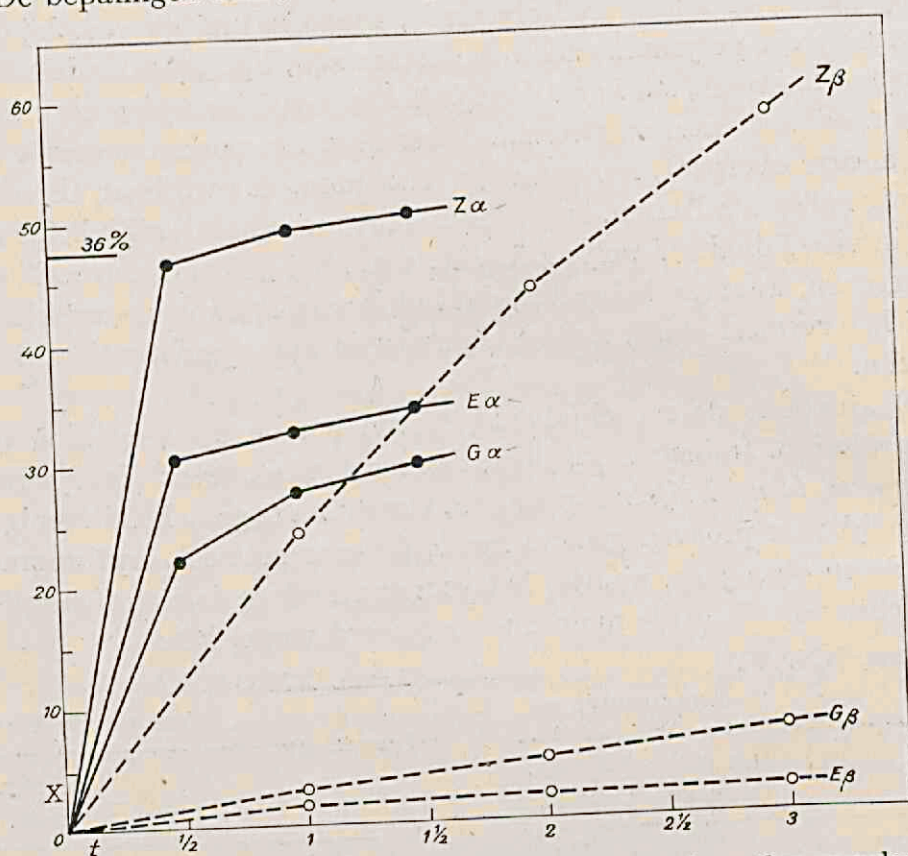


Fig. 6. Vergelijkende proeven met oplosbaar zetmeel, erythrogranulose en glycogeen. Abscis: tijd in uren; ordinaat: maltose in mgr. Verdere verklaringen in den tekst.

α -moutamylase bij pH 5,75 uitgevoerd. Voor iedere bepaling werd 25 ccm. van het reactiemengsel gebruikt. In de tabellen XXXVIII en XXXIX ziet men de in de opgegeven tijden gevormde hoeveelheden maltose, terwijl fig. 6 een beeld geeft van het verloop der reacties. De als $Z\alpha$, $E\alpha$, en $G\alpha$ aangeduide krommen stellen de werkingen van α -moutamylase op zetmeel, erythr. granulose en glycogeen voor; de krommen $Z\beta$, $E\beta$ en $G\beta$ hebben betrekking op de proeven met β -moutamylase.

Men ziet, dat β -moutamylase met glycogeen slechts een zeer geringe werking vertoont, evenals met erythrogranulose. In beide gevallen blijft de jodiumreactie bestaan, evenals bij de werking op oplosbaar zetmeel. De α -moutamylase doet met glycogeen niet alleen de jodiumreactie verdwijnen, maar vormt daarbij ook een vrij aanzienlijke hoeveelheid maltose, welke meer overeenkomt met de hoeveelheid, die onder dezelfde omstandigheden uit erythrogranulose gevormd wordt, dan met die, welke uit oplosbaar zetmeel ontstaat. In de figuur is verder aangegeven, welke hoeveelheid maltose overeenkomt met 36 % v. d. theorie; men ziet, dat ook bij deze proef de werking van de α -moutamylase met oplosbaar zetmeel in de nabijheid van dit percentage tot stilstand komt.

Bij de werking van β -moutamylase op glycogeen had zich na 24 uur 19,6 mgr. maltose gevormd. Ook bij langdurige inwerking vindt dus niet een aanzienlijke suikervorming plaats.

Om te zien, of bij gebruik van glycogeen als substraat soms een verschuiving van het optimum der α -moutamylase zou plaatsvinden, werden de bepalingen, vermeld in tabel XXXX verricht. De samenstelling van het reactiemengsel was als bij de vergelijkende proeven, alleen was de enzymoplossing verdund tot $1/3000$.

TABEL XXXX

pH	t min.	X mgr. malt.
4,20	45	7,1
4,60	45	16,1
5,10	45	17,8
5,40	45	18,3
5,75	45	18,9
6,15	45	15,8
6,55	45	10,4

Het optimum ligt, zooals men ziet, ook hier bij pH 5,75. Aan de alkalische zijde valt de kromme volkomen samen met die, welke bepaald was met erythrogranulose als substraat, aan de zure zijde is er een afwijking (fig. 7). Het is niet duidelijk, waaraan deze moet worden toegeschreven, wellicht speelt hier de verschillende afkomst der praeparaten een rol.

Wanneer wij de zeer verschillende afkomst der beide substraten

in aanmerking nemen, dan blijkt er dus wel een merkwaardige overeenkomst te zijn tusschen glycogeen en erythrogranulose of α -zetmeel, wat hun gedrag ten opzichte van de beide moutamylasen betreft. Doch ook in andere opzichten vertoonen zij gelijkenis. Beide

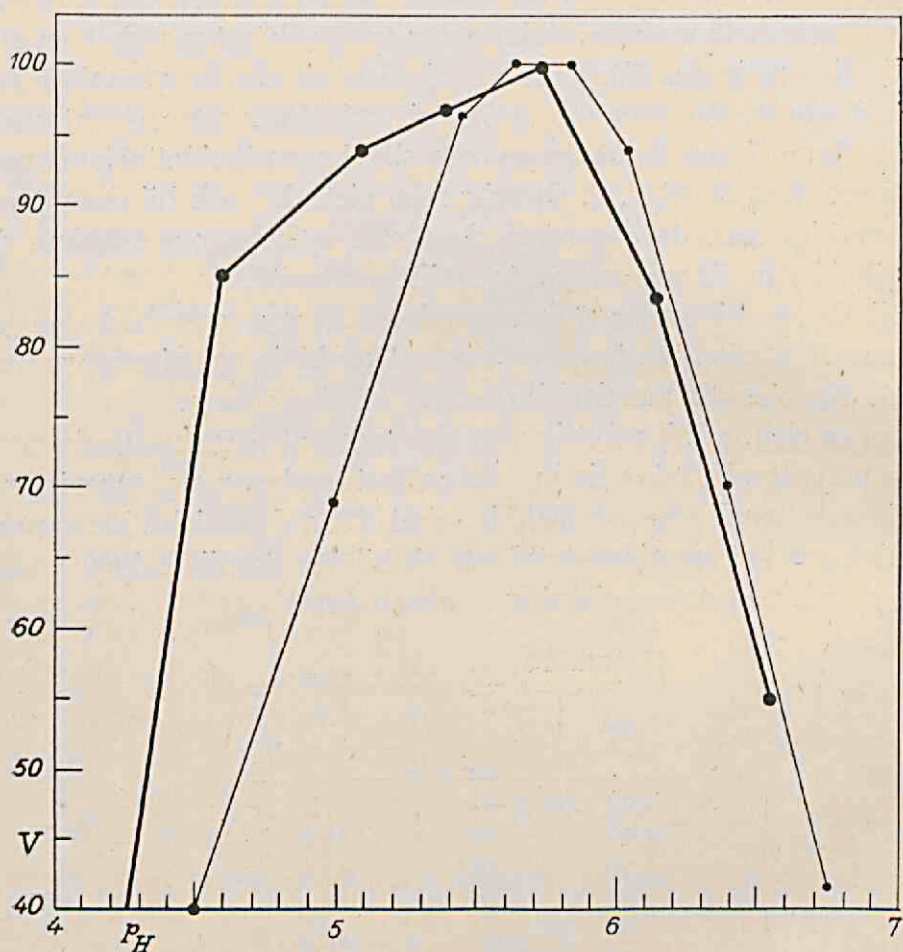


Fig. 7. pH-kromme van α -moutamylase op glycogeen (dikke lijn) en op erythrogranulose (dunne lijn).

stoffen gaan reeds bij schudden met koud water eenigszins in „oplossing”, bij verhitten tot koken lossen zij gemakkelijk op tot een betrekkelijk sterk opalesceerende vloeistof, echter zonder de voor gewoon aardappelmeel zoo typische stijfselpap te vormen.

Ook het specifiek draaiingsvermogen $[\alpha]_D$ van erythrogranulose ligt zeer nabij dat van glycogeen. In het geheel heb ik van drie stoffen de draaiing onderzocht: van oplosbaar zetmeel, van erythro-

granulose en van glycogeen. De bepalingen geschieden met een zgn. „Halbschatten-apparat” volgens LAURENT; als lichtbron werd een natriumlamp gebruikt (D-lijn).

Oplosbaar zetmeel

Een oplossing van 2 % vertoonde in een buis van 2 dM. bij 20° een draaiing van + 8,62°; 8,62° (twee bepalingen).

Uit de formule $[\alpha]_D = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot p \cdot d}$, waarin α de afgelezen draaiingshoek voorstelt, l de lengte van de buis in dM., p de concentratie van de stof in gr. per 100 gr. oplossing en d de dichtheid (die hier = 1 zal worden genomen), valt dan te berekenen:

$$[\alpha]_D^{20} = + \underline{215^\circ}$$

Erythrogranulose

Een zorgvuldig gefiltreerde oplossing werd eerst zoo ver verdund, dat de draaiing ervan in een buis van 2 dM. nauwkeurig kon worden afgelezen. Vervolgens werd deze oplossing op gehalte onderzocht door hydrolyse met HCl op de beschreven wijze.

Draaiing: + 1,68°; 1,64°; 1,66°; 1,66°; gem. 1,66°.

Gehalte: 0,427 %. Daaruit is te berekenen:

$$[\alpha]_D = + \underline{194^\circ}$$

Glycogeen

Een werkelijke 1 %-oplossing werd met zijn volume water verdund en gaf in een buis van 2 dM.:

Draaiing: + 1,95°; 1,98°; 1,98°; gem. 1,97°.

Daaruit volgt:

$$[\alpha]_D = + \underline{197^\circ}$$

HUPPERT ¹⁾ vond voor leverglycogeen $[\alpha]_D = + 196,6^\circ$, een waarde die, naar hij opmerkt, zeer dicht nabij komt aan die van „erythrodextrine”, een stof, die LINTNER en DUELL ²⁾ kregen door zetmeeloplossing met moutamylase (α - β) te behandelen tot de jodiumreactie roodbruin was en het restproduct met alcohol neer te slaan; zij geven hiervoor $[\alpha]_D = + 196^\circ$. Deze stof vertoonde slechts een zeer gering reduceerend vermogen en kan als nagenoeg identiek met erythrogranulose beschouwd worden. Het zelfde geldt

1) H. HUPPERT, H. 18, 137 (1893).

2) C. J. LINTNER u. G. DÜLL, Ber. Chem. Ges. 26, 2533 (1893).

voor de „ α -amylodextrine” van BAKER ¹⁾ met $[\alpha]_D = +190$ — 195° en de „ α - β -hexa-amylose” van LING en NANJI ²⁾ met $[\alpha]_D = +193^\circ$.

3 — Resultaten van andere onderzoekers

Gaan wij nu verder na in hoeverre de resultaten van andere onderzoekers in dezelfde richting wijzen als de onze, dan kunnen wij, wat het gedrag van de β -moutamylase betreft, opmerken, dat over het algemeen bij de hydrolyse met „moutamylase”, waarvan de werking grootendeels bepaald wordt door de β -component, een meer of minder sterke remming geconstateerd is, wanneer 60—65 % van de theorie maltose gevormd was. Heel sterk trad de remming op bij gebruik van amylase uit ongekiemde gerst (BAKER; LING; SJOEBERG; SABALITSCHKA); de door de verschillende auteurs opgegeven grens van de afbraak varieert van 60—67 %. In alle gevallen bleef de jodiumreactie bestaan. Uit onze ervaringen blijkt, dat 64 % als de werkelijke grens moet worden beschouwd. Wat de grensafbraak van de α -moutamylase betreft, hieromtrent heb ik slechts één mededeeling kunnen vinden en wel bij POLAK en TYCHOWSKY ³⁾, die vermelden, dat moutextract, dat gedurende 15 min. op 70° C. verhit was, uit „amylose” volgens SHERMAN en BAKER, zeer snel 35 % maltose vormt, waarbij de jodiumreactie verdwijnt, terwijl verdere versuikering veel langzamer volgt.

Volgens onze voorstelling moet natuurlijk iedere α -amylase in de nabijheid van 36 % een remming vertoonen. Aanwijzingen daaromtrent vinden wij in eenige tabellen van KUHN ⁴⁾. Bij de werking van gezuiverde pankreas-amylase op „amylose” (volgens SHERMAN en BAKER ⁵⁾), vertoont de reactie een sterke remming nadat 40 % suiker is gevormd; bij de „Takadiastase”, werkende op door electrodialyse gezuiverd oplosbaar zetmeel (volgens LINTNER), treedt deze remming op bij 35—36 %. In fig. 8 zijn deze tabellen in den vorm van de krommen a en b weergegeven. De kromme c heeft betrekking op onze α -moutamylase en is ontleend aan tabel XXXVII

1) l. c. pag. 8.

2) l. c. pag. 9.

3) F. POLAK u. A. TYCHOWSKY, Biochem. Zts. **214**, 216 (1929).

4) RICHARD KUHN, A. **443**, en wel pag. 33 en 61 (1925).

5) Zie pag. 76.

(deze diss. pag. 59). De figuur toont wel aan, dat de α -moutamylase zich in haar gedrag zeer goed bij de andere α -amylasen aansluit.

Uit onze proeven, beschreven op pag. 45, blijkt, dat erythrogranulose veel moeilijker dan oplosbaar zetmeel versuikerd wordt door α - β -moutamylase. Hetzelfde verschijnsel is voor glycogeen geconstateerd, zoowel door Mlle. PHILOCHE ¹⁾ als door EADIE ²⁾. Wij

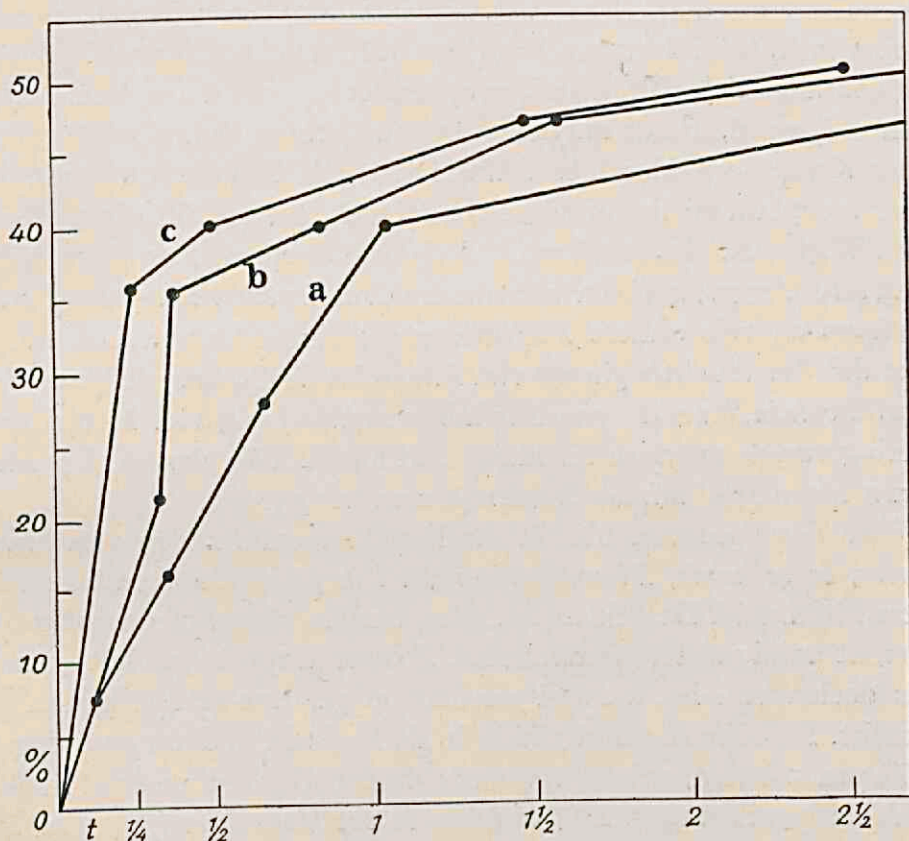


Fig. 8. Verloop van de hydrolyse van „oplosbaar” zetmeel met verschillende α -amylasen. a. pancreas-amylase, b. Takadiastase, c. α -moutamylase; a en b volgens KUHN.

hebben gezien, dat dit aan de β -component van de moutamylase moet worden toegeschreven. Mlle. PHILOCHE vond bovendien, dat glycogeen gemakkelijk wordt aangetast door pancreas-amylase (α -amylase). Het verband tusschen deze verschijnselen

1) l. c. pag. 16.

2) G. S. EADIE, Bioch. Journ. 20, 1016 (1926).

wordt duidelijk, wanneer wij aannemen, dat zoowel glycogeen als erythrogranulose uit α -zetmeel bestaat.

Verder eischt onze voorstelling, dat het voorkomen van glycogeen steeds zal samengaan met de aanwezigheid van enkel α -amylase, terwijl overal waar zetmeel voorkomt, α - β -amylase moet worden aangetroffen. Van pankreas-amylase en *Aspergillus*-amylase staat de natuur als α -amylase vast. Speeksel-amylase vertoont evenals α -moutamylase alleen een kleurloos diffusieveld in zetmeel-gelatine en gedraagt zich ook in andere opzichten als een α -amylase. BEYERINCK ¹⁾ vond, dat de amylase van een bacterie *Granulobacter* eveneens slechts een kleurloos diffusieveld gaf. BEYERINCK heeft ook zeer veel plantaardige amylasen onderzocht met de diffusie-methode van WIJSMAN. Genoemd worden de amylasen uit kiemende zaden van *tarwe*, *rogge*, *mais* en vele andere *Gramineën*; *Vicia faba*, *Pisum sativum* en vele andere *Papillionaceën*; verder de amylase uit de wanden der vruchtbeginsels van *Phaseolus* en *Cytisus*; de bladstelen van *Robinia*, knollen van *Sagittaria sagittaeifolia*, etc. Met uitzondering van de amylase uit mais vond hij, dat alle plantaardige amylasen een meer of minder breeden paarsen ring gaven.

Van deze proeven heb ik die met kiemende zaden van *tarwe*, *haver*, *rogge*, *mais*, *Pisum sativum*, *Vicia faba* en *Phaseolus multiflorus* herhaald. De gekiemde zaden werden stukgesneden of geplet en met weinig water geëxtraheerd. Zoowel druppels van het extract, als deelen van het weefsel werden op gelatine-zetmeelplaten gebracht. De diffusie vond plaats in de koelkast gedurende 6 dagen. Alle praeparaten, ook die van *mais*, vertoonden een meer of minder breeden paarsen ring. De β -amylase is dus klaarblijkelijk een typisch enzym van de groene plant, zooals ook het zetmeel een typisch plantaardig product is.

4 — Eenige bezwaren

Vervolgens komen wij er toe, eenige feiten te beschouwen, die als bezwaren tegen de voorstelling van een α - en een β -zetmeel kunnen worden opgevat.

Wanneer de α -moutamylase uit oplosbaar zetmeel 36 % maltose vormt, dan mogen wij verwachten, dat een praeparaat van

1) l. c. pag. 8.

α -zetmeel door dit enzym volledig zal worden omgezet. Dat is echter niet het geval, de α -moutamylase ondervindt bij de werking op erythrogranulose blijkbaar een aanzienlijke belemmering. Uit fig. 6 is zelfs te zien, dat een bepaalde hoeveelheid α -moutamylase uit oplosbaar zetmeel meer maltose vormt, dan uit eenzelfde hoeveelheid erythrogranulose, hoewel het eerstgenoemde substraat slechts voor 36 %, het laatstgenoemde voor ca. 100 % uit α -zetmeel bestaat. Wanneer alleen de *concentratie* van het substraat het verloop van de reactie bepaalde, dan zou onze voorstelling moeilijk juist kunnen zijn. Wij moeten echter bedenken, dat niet alleen het substraat, maar ook het enzym in kolloide oplossing aanwezig is, terwijl bovendien het enzympraeparaat niet vrij is van begeleidende stoffen, voornamelijk van eiwit-achtigen aard, die onder omstandigheden een rol kunnen spelen. Merkwaardig is, dat met glycogeen dezelfde belemmering optreedt als met erythrogranulose. KUHN vindt, dat glycogeen door gezuiverde pankreasamylase gemakkelijk voor 100 % in maltose kan worden omgezet, zoodat de belemmering dus niet karakteristiek is voor de α -amylasen in het algemeen. Een onderzoek naar de oorzaak van het verschijnsel is door mij niet ingesteld, aangezien dit een werk op zichzelf zou zijn geworden. Waarschijnlijk zullen, nadat een oppervlakkige hydrolyse heeft plaatsgehad, de onzuiverheden, die zich in de α -moutamylase bevinden, aan de deeltjes (micellen) van het α -zetmeel, die blijkbaar een groote neiging hebben stoffen te adsorbeeren (jodiumreactie!), worden geadsorbeerd, waardoor de omzetting tot stilstand komt. Daarop wijst ook het verschijnsel, dat bij de werking van de α -moutamylase na korten tijd een *uitlokking* optreedt, die des te sneller ontstaat, naarmate de reactie sneller verloopt. Dat de 36 % α -zetmeel, die zich in het oplosbare zetmeel bevinden, zooveel gemakkelijker in hun geheel worden gehydrolyseerd, zou dan zoo verklaard kunnen worden: de moleculen α -zetmeel vormen hier niet één compacte massa, maar liggen verspreid tusschen een bijna $2 \times$ zoo groot aantal β -zetmeelmolekulen, waardoor het enzym een grootere werkzame oppervlakte aangeboden wordt.

Een ander feit, dat niet in overeenstemming is met wat wij zouden mogen verwachten is, dat het specifieke draaiingsvermogen van glycogeen en erythrogranulose (α -zetmeel) lager ligt, dan dat van het oplosbare zetmeel (α - β -zetmeel) en dus ook lager dan dat

van β -zetmeel, terwijl zoowel α -maltose, α -glucose en de α -glucosiden een *hooger* specifiek draaiingsvermogen hebben, dan de β -componenten van deze stoffen. Het is de vraag, in hoeverre de eigenschappen van de zetmeelen en die van de eenvoudige glucosiden met elkaar vergeleken kunnen worden, m.a.w. of het draaiingsvermogen der zetmeelen alléén bepaald wordt door den aard der glucosidische bindingen, die er in voorkomen, of dat ook andere structuureigenaardigheden deze grootheid beïnvloeden. Wij komen op deze kwestie in het volgende hoofdstuk nog even terug.

Wat de kleuring met jodium betreft, die bij glycogeen roodbruin, bij erythrogranulose blauw of paars is, daaraan kan naar mijn meening niet een groote beteekenis worden toegekend. Vrij zeker speelt hier de voorgeschiedenis der praeparaten een rol. Wanneer men n.l. erythrogranulose of ook oplosbaar zetmeel behandelt met α -moutamylase, dan ziet men de paarse kleur zeer snel in roodbruin overgaan.

De hier geformuleerde bezwaren maken natuurlijk, dat de twee-componenten-theorie van het zetmeel, in den door mij gegeven vorm, een zeker speculatief karakter behoudt. Het komt mij echter voor, dat niet een van deze bezwaren als een positief bewijs *tegen* de theorie beschouwd mag worden en dat de argumenten pro zeker tegen de contra-argumenten opwegen.

In het volgende, laatste hoofdstuk, zal worden nagegaan, in hoeverre α -zetmeel en β -zetmeel in verband kunnen staan met „amylose” en „amylopektine” en of uit de hiervoor beschreven proeven met de moutamylasen ook iets omtrent de structuur der beide zetmeelen kan worden afgeleid.

VII

DE BEIDE COMPONENTEN VAN HET ZETMEEL EN HUN VERHOUDING TOT GLYCOGEEN

1 — *Amylose, amylopektine en glycogeen*

De literatuur van het zetmeel is zoo omvangrijk, gecompliceerd en vol van tegenstrijdigheden, dat het niet mogelijk is om in een kort bestek een ook maar bij benadering volledig overzicht te geven. Ik moet mij daarom beperken tot eenige kwesties, die in nauw verband staan met het hiervoor beschreven onderzoek. Voor een meer volledig overzicht kan ik b.v. verwijzen naar H. PRINGSHEIM, *Die Polysaccharide* ¹⁾, waarin de huidige stand van onze kennis vrij nauwkeurig, hoewel weinig critisch, wordt samengevat.

Reeds NAEGELI ²⁾ heeft twee zetmeelcomponenten onderscheiden. Volgens hem ontstaan de zetmeelkorrels door intussusceptie, de buitenste laag is de oudste en droogste en bestaat uit „zetmeel-cellulose”, de inhoud noemt hij „zetmeel-granulose”. Deze opvatting werd bestreden door SCHIMPER ³⁾ en later door ARTHUR MEYER ⁴⁾, die aantoonde, dat de zetmeelkorrels door appositie groeien tot laagsgewijs gebouwde sphaerokrystallen. Toch onderscheidt ook ARTHUR MEYER twee componenten, een die de buitenste laag van de korrel vormt, β -amylose, en een, die de inhoud uitmaakt, α -amylose. Het verschil ligt volgens hem niet in de chemische structuur, maar in den graad van hydratatie. Volgens HUGO DE VRIES ⁵⁾ zou het zetmeel niet uit twee verschillende koolhydraten, maar uit één stof in verschillende graden van dichtheid bestaan.

1) H. PRINGSHEIM, *Die Polysaccharide*, 3. Aufl. Berlin (1931) pag. 174.

2) C. NÄGELI, *Die Stärkekörner*, Zürich (1858).

3) A. F. W. SCHIMPER, *Bot. Zeit.* **38**, 881 (1880).

4) A. MEYER, *Untersuchungen über die Stärkekörner*. Jena (1895).

5) HUGO DE VRIES, *Opera e per. collata*, Vol. **4**, pag. 471 (1878).

Uitvoerig is de kwestie daarna onderzocht door MAQUENNE met verschillende medewerkers en ROUX ¹⁾, die de namen „amylose” en „amylopektine” hebben ingevoerd voor resp. de inhoud en het omhulsel. De „amylose” geeft een heldere, niet viskeuze oplossing, zij kleurt zich met jodium blauw en wordt door moutamylase geheel in maltose omgezet. De „amylopektine” vormt bij verwarming de „stijfsel”; de zeer viskeuze pap, die men krijgt, wanneer men aardappelmeel in kokend water tracht op te lossen, bestaat dus uit verstijfselde „amylopektine”, vermengd met „amylose”-oplossing. De „amylopektine” geeft geen kleuring met jodium en wordt door het „suikervormend” enzym van de moutamylase niet aangetast, wel door het „zetmeeloplossende” enzym, dat men dan ook feitelijk „amylopektinase” zou moeten noemen. In aardappelmeel komen 80—85 % „amylose” voor, naast 15—20 % „amylopektine”. Met behulp van moutamylase kunnen ze gescheiden worden.

Een andere scheidingsmethode geeft GATIN-GRUSZEWSKA ²⁾ aan. Zij behandelt aardappelmeel met 1 % NaOH-oplossing, waardoor het „omhulsel” springt; de inhoud, „amylose”, gaat in oplossing, terwijl de „amylopektine” in den vorm van leeg zakjes neerslaat. Volgens haar zou het aardappelmeel 55—60 % „amylose” naast 40—45 % „amylopektine” bevatten.

SHERMAN en BAKER ³⁾ trachten een scheiding tot stand te brengen door aardappelmeel bij 80° C. te verstijfselen onder toevoeging van een weinig NaCl, vervolgens worden de componenten door centrifugeeren gescheiden. Er ontstaan dan twee lagen, waarvan de bovenste de „amylose” bevat, deze wordt afgeheveld, de rest met water vermengd en vervolgens opnieuw gecentrifugeerd. Op deze wijze wordt de „amylose” uit de „amylopektine” geëxtraheerd. Beide vloeistoffen worden tenslotte in een autoclaaf verhit. De opbrengst aan „amylopektine” blijkt eenigszins af te hangen van den duur der verstijfseling, na 2—4 uur werden 66 % verkregen.

SAMEC en HAERDTL ⁴⁾ voeren weer een andere scheidingsmethode

- 1) L. MAQUENNE et E. ROUX, Bull. Soc. Chim. France (3) **33**, 723 (1905).
L. MAQUENNE, Bull. Soc. Chim. France, (3) **35**, I—XV (1906).
- 2) Z. GATIN-GRUSZEWSKA, C. r. Acad. Sc. **146**, 540 (1908).
- 3) H. C. SHERMAN and J. C. BAKER, J. Am. Chem. Soc. **38**, 1885 (1916).
- 4) M. SAMEC und H. HAERDTL, Koll. Beih. **12**, 281 (1920).

in, n.l. door electrodialyse van zetmeelstijfsel. Daarbij gaat de „amylopektine” naar de positieve pool, waarbij het in den vorm van een gel bezinkt, de „amylose” blijft in oplossing. Verschillende zetmeelsoorten bevatten de beide componenten in verschillende verhoudingen, in aardappelmeel is volgens SAMEC de verhouding: 83 % „amylopektine” tegen 17 % „amylose”.

LING en NANJI¹⁾ bevrozen een zetmeelstijfelpap van 5% en houden die dan gedurende 12 uur bij — 10° C. Bij het opwarmen slaat de „amylopektine” als een wollige massa neer, terwijl de „amylose” in oplossing blijft. Men krijgt op deze manier 14 % „amylose”, dit is echter veel minder dan in werkelijkheid aanwezig is, aangezien de „amylose” moeilijk uit de gelatineuze „amylopektine” is te extraheeren (Na-carbonaat bevordert de extractie). Een goede scheiding krijgt men door zetmeelstijfelpap bij 50° C. te behandelen met door alcohol neergeslagen en gedroogde *amylase uit ongekiemde gerst*, die de „amylose” geheel in maltose omzet, terwijl de „amylopektine” achterblijft. Volgens deze methode vinden zij 66,6 % „amylose” tegen 33,3 % „amylopektine”. Bij gebruik van gerstextract zonder droging met alcohol krijgen zij niet „amylopektine” maar „ α - β -hexa-amylose”, een stof, die alle eigenschappen vertoont van ons α -zetmeel. Waar het verschil tusschen „amylopektine” en „ α - β -hexa-amylose” precies op neerkomt is niet duidelijk, van een suikervorming bij de overgang van de eene stof in de andere wordt niet gesproken, evenmin verdwijnt de jodiumreactie. Waarschijnlijk beschouwen LING en NANJI de laatstgenoemde stof als depolymerisatieproduct van „amylopektine”.

Men ziet dus, dat het door verschillende onderzoekers opgegeven gehalte van aardappelmeel aan „amylopektine” uiteenloopt van 15—20 % bij MAQUENNE tot 83 % bij SAMEC. PRINGSHEIM beschouwt de door SAMEC opgegeven verhouding als juist: „Wenn „gelegentlich ganz andere Zahlen für den Gehalt der Stärke an „Hüll- und Inhaltssubstanz angegeben werden, dann handelt es „sich entweder nicht um Kartoffelstärke oder es wurden Trennungsmethoden herangezogen, die zu falschen Ergebnissen führten”²⁾. Door een dergelijke willekeurige beslissing wordt echter het *feit* der uiteenlopende resultaten volstrekt niet verklaard. Merkwaardig

1) A. R. LING and D. R. NANJI, J. Chem. Soc. London, **123**, 2666 (1923).

2) Die Polysaccharide, pag. 186.

is bovendien, dat PRINGSHEIM vasthoudt aan de voorstelling van een „inhoud” en een „omhulsel” van de zetmeelkorrel, hoewel 83 % voor een „omhulsel” toch rijkelijk veel genoemd mag worden. Het kan zijn, dat de buitenste lagen van de zetmeelkorrel door indroging een grootere resistentie verkrijgen tegenover sommige chemikaliën dan het inwendige, maar met chemisch verschillende componenten kunnen wij hier onmogelijk te maken hebben, daar de zetmeelkorrels in de plant steeds verder „groeien” en dus steeds nieuwe buitenste lagen krijgen ¹⁾.

Wat de kwestie omtrent de chemische natuur der beide zetmeelcomponenten betreft, daarbij moeten wij in de eerste plaats bedenken, dat de scheiding volgens *twee, principieel verschillende methoden* is uitgevoerd: door MAQUENNE en door LING en NANJI met behulp van amylase, al dan niet uit ongekiemde gerst, waarbij, zooals wij met het oog op onze eigen proeven kunnen zeggen, inderdaad een chemische scheiding zal hebben plaats gehad — en door GATIN-GRUSZEWSKA, SHERMAN en SAMEC langs zuiver kolloidchemischen weg ²⁾. Beschouwen wij eerst de laatstgenoemde methode, dan kunnen wij zeggen, dat deze in alle gevallen neerkomt op de scheiding van een sol en een gel, dus van twee verschillende *toestanden*, waarbij de verdunde loog en het keukenzout als peptisator hebben gefunctioneerd. *Daarom* wisselt de door SHERMAN gevonden verhouding met de wijze van behandeling en vindt GATIN-GRUSZEWSKA een volgens PRINGSHEIM te groote hoeveelheid „amylose”.

Toch stelt SAMEC zich op het standpunt, dat zijn „amylopektine” zich onderscheidt van zijn „amylose” ook wat de chemische samenstelling betreft ³⁾. De „amylopektine” bevat n.l. een geringe hoeveelheid fosphaat (gem. 0,175 %, uitgedrukt als P_2O_5), die daarin niet aanwezig zou zijn als een verontreiniging, maar in den vorm van een phosphorzure ester, welke de hoge viscositeit van zetmeelstijfseelpap zou veroorzaken. Tegen deze voorstelling bestaan echter ernstige bezwaren. Zoo geeft glycogeen, dat meer dan $4 \times$ zooveel fosphaat bevat, dan „amylopektine”, in het geheel niet die zeer

1) Zie ook BENECKE-JOST, Pflanzenphysiologie, 4. Aufl. Jena (1924), Bd. I pag. 256.

2) Zie ook J. J. LIJNST-ZWIKKER, Rec. Trav. Bot. Néerl. 18, 1 (1921).

3) M. SAMEC und F. v. HOEFFT, Koll. Beih. 5, 141 (1913).

viskeuze pap, welke karakteristiek is voor aardappelzetmeel en andere zetmeelsoorten. Andere bezwaren zijn naar voren gebracht door v. D. HOEVE ¹⁾ op grond van viskositeitsmetingen aan verstijseld aardappelmeel. De zetmeelkorrel moeten wij ons denken als te zijn opgebouwd uit micellen, dwz. complexen van een meer of minder groot aantal moleculen, waartusschen zich capillairen bevinden, die met water gevuld zijn; in dat water komt het phosphaat als verontreiniging voor. In het zetmeelsol, de „amylose”, zijn de micellen vrij in de oplossing aanwezig, in de verstijselde korreldeelen, de „amylopektine”, zijn zij aan elkaar gekit. Oplosbaar zetmeel volgens LINTNER geeft bij oplossing eveneens vrije micellen en wordt door v. D. HOEVE dan ook eveneens „amylose” genoemd.

Het zal duidelijk zijn, dat het bij een dergelijke stand van zaken geen zin had „amylose” en „amylopektine” volgens SAMEC, SHERMAN of GATIN-GRUSZEWSKA te bereiden. Zoo bleef dan de bewerking volgens LINTNER over als de eenvoudigste manier om over een groote hoeveelheid zetmeeloplossing (sol) van gelijke qualiteit te kunnen beschikken. Wat er nu precies gebeurt bij deze bewerking van het aardappelzetmeel is, zooals reeds in het tweede hoofdstuk werd opgemerkt, niet met zekerheid bekend. Het waarschijnlijkst is, dat zich in het aardappelmeel een of meer stoffen bevinden, die de stijsel-(gel-)vorming bevorderen of wellicht meer precies: de peptisatie belemmeren, en dat deze stoffen door het verdunde zoutzuur worden weggenomen.

Keeren wij nu terug tot de eerstgenoemde categorie van scheidingsmethoden. Het spreekt vanzelf, dat de „amylopektine” van LING en NANJI (om het verouderde onderzoek van MAQUENNE verder onbesproken te laten) *een geheel ander product is*, dan de „amylopektine” van de drie zooeven genoemde onderzoekers. Uit de bereidingswijze en uit de eigenschappen volgt wel, dat het in hoofdzaak dezelfde stof moet zijn als de erythrogranulose van WIJSMAN, door mij α -zetmeel genoemd. Het behoeft dan ook niet te verwonderen, dat zij tot een verhouding van de beide componenten komen, die zeer nabij de mijne ligt, n.l. 67—33 ongeveer, waarin zij de „mooie”, maar nietszeggende verhouding 2 : 1 bespeuren.

1) J. A. v. d. Hoeve, Verstijseling van aardappelzetmeel. Diss. Utrecht (1930).

Dit alles nu is van belang met het oog op de door PRINGSHEIM uitgesproken meening, dat „amylopektine” in „oplosbaren” toestand, dwz. (altijd volgens PRINGSHEIM!) bevrijd van fosphaat, *identiek zou zijn met glycogeen*¹⁾. PRINGSHEIM is de eenige, die deze identiteit aangeeft en hij grondt zijn opvatting ten deele op de gelijkheid van de jodiumreactie, de gemiddelde deeltjesgrootte en van het specifieke draaiingsvermogen, maar vooral op de resultaten van de chemische afbraak. Bij de verhitting van glycogeen in glycerine ontstond „trihexosaan”, dat met een uit „amylopektine” verkregen „trihexosaan” overeenkwam. „Amylose” leverde bij deze bewerking „dihexosaan”. Door koud geconc. zoutzuur werd uit glycogeen evenals uit „amylopektine” een trisaccharide „amylotriose” verkregen, terwijl „amylose” een disaccharide, „amylobiose”, gaf. Hoewel de meeningen uiteen loopen over de betrouwbaarheid van de door PRINGSHEIM gebruikte methode bij de bepaling van de constitutie van zijn afbraakproducten (bepaling van het moleculairgewicht uit de vriespuntsdaling), mogen wij toch wel aannemen, dat het *dezelfde producten* geweest zijn, die hij uit „amylopektine” en glycogeen kreeg.

Uit de ervaringen van SHERMAN en BAKER daarentegen blijkt, dat het door hen vervaardigde „amylopektine” in ieder geval niet identiek geweest kan zijn met glycogeen. Het werd n.l. door moutamylase met vrijwel dezelfde snelheid gehydrolyseerd als „amylose” en oplosbaar zetmeel; het eenige verschil was, dat het wat minder ver dan deze praeparaten werd afgebroken. Daarentegen staat glycogeen bekend als een slecht substraat voor moutamylase, zooals reeds in het vorige hoofdstuk werd vermeld.

Tot dezelfde conclusie komt men naar aanleiding van het onderzoek van SJOEBERG en ERIKSSON²⁾, die amylase uit ongekiemde gerst en uit mout lieten werken op „amylose” en „amylopektine” volgens GATIN-GRUSZEWSKA, juist met de bedoeling om na te gaan, of de beide zetmeelcomponenten ook in enig verband zouden staan tot de beide soorten van amylase. Niets van dien aard kon worden aangetoond; zoowel gerstamylase als moutamylase maakte uit „amylopektine” minder maltose vrij, dan uit „amylose”, wat vol-

1) H. PRINGSHEIM, Ber. Chem.Ges. **57**, 1581 (1924). Zie ook Die Polysaccharide, pag. 214.

2) l. c. pag. 10.

komen begrijpelijk is, wanneer het eene een gel, het andere een sol voorstelt.

Ziehier dus een tegenstrijdigheid, die echter begrijpelijk wordt, wanneer we nagaan op welke wijze PRINGSHEIM zijn „amylopektine” bereidde. Hoewel hij zich met SAMEC op het standpunt stelt, dat aardappelzetmeel 83 % „amylopektine” bevat, heeft hij toch voor de bereiding daarvan in navolging van LING en NANJI gebruik gemaakt van amylase uit ongekiemde gerst: „Um das Amylopektin „frei von Amylose zu erhalten, behandle ich es im Verfolge eines „Vorschlages von LING bei Zimmertemperatur mit einer mit Alkoh., hol gefällten Amylase aus ungekeimter Gerste, durch welche die „Amylose schneller als das Amylopektin gespalten wird ¹⁾. Unter „Verzicht auf einen Teil des Amylopektins kommt man so in ver., hältnismäßig kurzem Arbeitsgange zu einem amylosefreien „Praeparat, etc.” ²⁾. Het resultaat van zijn experiment is echter moeilijk te vereenigen met deze redeneering; als opbrengst krijgt hij n.l. slechts 28 % „amylopektine” ³⁾, dwz. tegelijk met de 17 % „amylose” zouden 55 % „amylopektine” verdwenen zijn, wat niet op een snellere omzetting van de „amylose” wijst! Terecht maken LING en NANJI in een latere publicatie ⁴⁾ PRINGSHEIM op deze tegenspraak opmerkzaam.

Het blijkt dus wel, dat men de beide beteekenissen van het begrip „amylopektine” zorgvuldig onderscheiden moet. Doen wij dit en bedenken wij dus, dat de „amylopektine” van PRINGSHEIM ook weer niets anders is geweest dan ons α -zetmeel, dan zien wij, dat onze resultaten met die van PRINGSHEIM volkomen overeenstemmen. Wat echter aan hem zoowel als aan LING ontgaan is, dat is het verband tusschen de beide typen van amylasen en de beide componenten van het zetmeel. En dit zou wellicht niet het geval zijn geweest, indien zij bekend geweest waren met het reeds door WIJSMAN ontdekte feit, dat de amylase uit ongekiemde gerst identiek is met één van de beide moutamylasen. Zoo komen wij dan weer terug tot de reeds op pag. 18 gemaakte opmerking, dat de kennis van het werk van WIJSMAN vandaag nog in staat is, ons

1) Curs. van mij.

2) Die Polysaccharide, pag. 186.

3) Ber. Chem. Ges. **57**, 1583 (1924).

4) A. R. LING and D. R. NANJI, J. Chem. Soc. London **127**, 629 (1925).

inzicht in den samenhang der verschijnselen op dit zoo gecompliceerde gebied te verhelderen.

2 — *De structuur der zetmeelmoleculen*

Een tiental jaren geleden huldigde men de opvatting, dat zetmeel, cellulose, caoutchouc en andere niet- of alleen kolloidaal oplosbare stoffen slechts een betrekkelijk klein molecule in den eigenlijken zin des woords zouden bezitten en dat de bijzondere eigenschappen van deze stoffen hun oorzaak vonden in het feit, dat deze moleculen in hooge mate zouden zijn gepolymeriseerd, dwz. dat de „deeltjes”, waar wij in de praktijk mee te maken hebben, zouden bestaan uit een groot aantal van zulke eenvoudige moleculen, welke door moleculaire krachten (cohaesie) tot een stevig complex zouden worden samengebonden. Voor het zetmeel is deze voorstelling o.m. door KARRER ¹⁾ verdedigd. Door afbraak van zetmeel met *Bacillus macerans* ontstaan gekrystalliseerde dextrinen, zgn. polyamylosen, en de studie van deze stoffen leidde KARRER tot de overtuiging, dat het eigenlijke zetmeelmolecule uit niet meer dan 6 glucoseresten zou kunnen bestaan, dwz. dat in de bruto-formule van het zetmeel $(C_6H_{10}O_5)_n$ de n hoogstens 6 zou zijn. Voor „oplosbaar zetmeel” komt hij tot een nog eenvoudiger structuur, dit praeparaat beschouwt hij als een polymeer van diamylose, dat een anhyride van maltose is; hier zou de n dus niet grooter zijn dan 2. De werking der *amylase* is dan volgens KARRER een dubbele: eerst wordt het zetmeel gedepolymeriseerd tot diamylose, vervolgens vindt hydrolyse plaats van dit product, welke tot maltose voert. Deze omzettingen zouden door twee enzymen kunnen worden gekatalyseerd.

Het zal duidelijk zijn, dat wij hier terecht komen bij de twee-enzymen-theorie, zooals die door POTTEVIN ²⁾ naar voren is gebracht en ook door andere fransche onderzoekers, b.v. door MAQUENNE, wordt aangehangen.

Om te beginnen is het reeds zeer onwaarschijnlijk, dat een depolymerisatie, dus niet een eigenlijke chemische reactie, door een enzym zou worden gekatalyseerd; maar bovendien heeft het onderzoek der amylasen, met name het reeds door WIJSMAN, later door OHLSSON en nu ook door mij verkregen resultaat aangetoond, dat

1) P. KARRER und C. NÄGELI, *Helv. Chim. Acta*, 4, 169, 684 (1921);

2) l. c. pag. 8.

een depolymerisatie, welke dan tot uiting zou komen door het verdwijnen van de jodiumreactie *zonder suikervorming*, niet optreedt. Wel verdwijnt, onder invloed van de α -amylasen de jodiumreactie, echter alleen, *nadat een zekere hoeveelheid maltose is gevormd*, dus nadat het eigenlijke molecule is aangetast.

Ook van andere zijden hebben zich in den loop der laatste jaren de bezwaren tegen de polymerisatie-theorie opgestapeld. Het zou mij te ver voeren, daarover in bijzonderheden te treden, hier moge slechts worden vermeld, dat Röntgenografische onderzoekingen daarbij een belangrijke rol hebben gespeeld. Tegenwoordig is men er vrij algemeen van overtuigd, dat zetmeel en dergelijke stoffen een groot molecule hebben dat, bij het zetmeel, bestaat uit een keten van glucosidisch gebonden glucose-resten, dwz. de glucose-resten zijn hier niet door moleculaire krachten, maar door hoofdvalenties aan elkaar gekoppeld ¹⁾. Hoe lang deze ketens zijn en welken vorm zij hebben, recht, of gesloten, of ook vertakt, dit zijn vragen, die op het oogenblik nog niet kunnen worden beantwoord; zeker schijnt het echter wel te zijn, dat bij een en dezelfde stof de ketens niet allen dezelfde lengte hebben. Het begrip „molecule” komt daardoor eenigszins in het gedrang, daar wij onder een molecule steeds een atoomcomplex van bepaalde, constante samenstelling verstaan; KURT H. MEYER ²⁾ slaat daarom voor van „hoofdvalentieketens” te spreken.

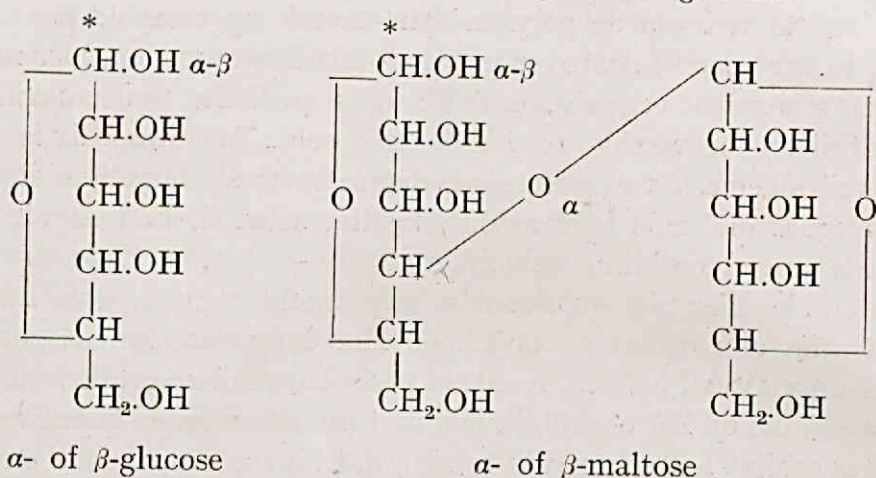
Wat nu de fijnere bouw van de hoofdvalentieketens van het zetmeel betreft, daarvan is nog vrijwel niets met volkomen zekerheid bekend. Met verdund zuur worden alle glucosidische bindingen gesplitst en er ontstaat glucose; met de amylasen worden zij om den ander aangegrepen, waardoor men maltose als eindproduct verkrijgt. De structuur van deze suiker is door HAWORTH en medewerkers met volkomen zekerheid bepaald ³⁾. Maltose (zie de formule) bestaat uit twee, glucosidisch gebonden glucose-resten. In

1) Zie echter: P. KARRER, Ueber Strukturfragen bei Polysacchariden; Union Internationale de Chimie: Rapports sur les hydrates de carbone (glucides), 1930, pag. 139.

2) KURT H. MEYER und H. MARK, Der Aufbau der hochpolymeren organischen Naturstoffe, Leipzig (1930), waarin men nadere bijzonderheden over deze kwesties vindt.

3) W. N. HAWORTH, The Constitution of Sugars, London (1929).

beide glucose-resten komt een O-atoom voor, dat deel uitmaakt van een zesring (pyraanring). De glucosidische binding verbindt het eerste C-atoom van de eene glucose-rest met het vierde C-atoom van de andere, zij is van α -glucosidischen aard, onverschillig, of men met α - of met β -maltose te maken heeft. Men drukt dit uit door te zeggen, dat maltose is een α -1,4-glucosido-glucose.



Het C-atoom, dat de reduceerende groep (aldehydgroep) draagt, is met een sterretje aangeduid. Van de plaats die de OH-groep aan *dit* C-atoom inneemt ten opzichte van het vlak van den zesring met O van deze glucose-rest, hangt het af, of wij met α - of β -maltose te maken hebben. Het verschil is natuurlijk alleen in een ruimtelijk model weer te geven.

De aard van de glucosidische binding blijkt eenerzijds uit het specifiek draaiingsvermogen, anderzijds uit het gedrag tegenover bepaalde enzymen, *glucosidasen* genaamd. Maltase (in den heden-daagschen zin des woords!) een α -glucosidase, is een katalysator voor de hydrolyse van maltose tot glucose; een β -glucosidase bezitten wij in de emulsine uit bittere amandelen.

Bij het zetmeel nu, doet zich o.m. het probleem voor van welken aard de glucosidische bindingen in de hoofdvalentieketens zijn en de vraag, die hier tenslotte behandeld zal worden is deze, in hoeverre de door mij verkregen resultaten bij de enzymatische analyse tot de oplossing van dit probleem kunnen bijdragen. Ik moet reeds direkt beginnen met te zeggen, dat een definitieve oplossing, bij den huidige stand van onze kennis, niet mogelijk is. Van ver-

schillende kanten komt men tot verschillende waarschijnlijkheden en de moeilijkheid ligt steeds bij de vraag, welk experiment nu eigenlijk als beslissend mag worden beschouwd.

Het ligt natuurlijk voor de hand om aan te nemen, dat ons α -zetmeel α -glucosidische bindingen bevat, ons β -zetmeel daarentegen β -glucosidische. Gaan wij nu na welke bezwaren tegen een dergelijke voorstelling bestaan, dan komen wij terug op het reeds in het vorige hoofdstuk besproken specifieke draaiingsvermogen van α -zetmeel, of glycogeen ($[\alpha]_D = +194-197^\circ$) en α - β -zetmeel (oplosbaar zetmeel): $[\alpha]_D = +215^\circ$. Daaruit zou volgen dat β -zetmeel een *hooger* draaiingsvermogen heeft dan α -zetmeel, terwijl alle β -glucosiden, voor zoover bekend, een *lagere* $[\alpha]$ hebben, dan de corresponderende α -glucosiden. KURT H. MEYER¹⁾ heeft volgens den regel van HUDSON²⁾ uit het verschil van het *moleculaire* draaiingsvermogen (d.i. het spec. draaiingsvermogen vermenigvuldigd met het moleculairgewicht) van β -maltose en β -glucose, het mol. draaiingsvermogen en daaruit weer het spec. dr.-vermogen berekend van een keten, die enkel α -1, 4-glucosidische bindingen bevat. Hij komt daarbij tot $[\alpha]_D = +226-222^\circ$, een waarde, die slechts weinig hooger ligt, dan die welke men meestal voor oplosbaar zetmeel vindt.

Dit is de eene kant van de zaak. Daartegenover staat KUHN's ontdekking van het bestaan van α -amylasen en β -amylasen. KUHN legt er den nadruk op, dat deze amylasen hun naam ontleenen aan den vorm van maltose, die zij doen ontstaan, en niet aan den aard der bindingen, die zij hydrolyseeren; dit in tegenstelling tot de α - en β -glucosidasen. Wanneer wij echter zien, dat de α -glucosidasen uit α -glucosiden α -glucose doen ontstaan, de β -glucosidasen uit β -glucosiden β -glucose, dan is de verleiding toch wel zeer groot om aan te nemen, dat ook met de amylasen op verschillende glucosidische bindingen wordt gereageerd. KUHN doet dit in zooverre, dat hij in het zetmeel afwisselend een α - en een β -binding aanneemt. Bij de werking van de amylasen zouden dan niet alleen glucosidische bindingen worden gesplitst, maar tevens omkeeringen en verspringen van den zuurstofring in de glucoseresten plaatsvinden op

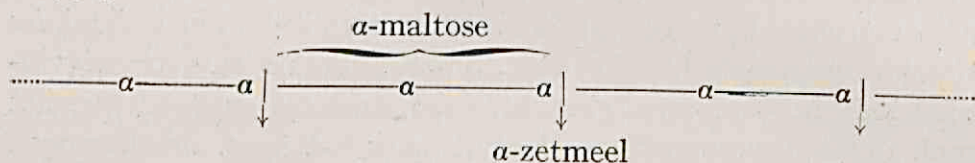
1) MEYER-MARK, pag. 210.

2) C. S. HUDSON, J. Am. Chem. Soc. **32**, 338 (1910); zie voor critiek hierop HAWORTH, Const. of Sugars, pag. 10.

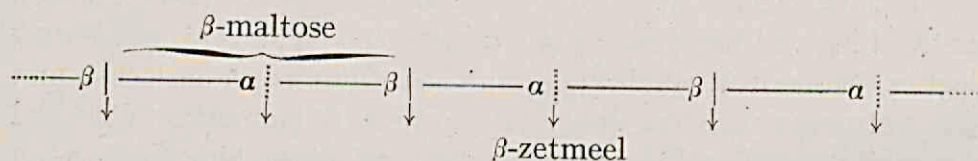
zoodanige wijze, dat tenslotte uit hetzelfde substraat met α -amylase, α -maltose en met β -amylase, β -maltose ontstaat.

Ons onderzoek nu, waaruit blijkt, dat de beide amylasen niet alleen verschillende maltosen vormen, maar ook verschillende zetmeelen aantasten, doet hun gelijkenis met de beide glucosidasen nog sprekender worden en maakt dus ook de waarschijnlijkheid groter, dat in een der beide zetmeelcomponenten β -glucosidische bindingen aanwezig zijn.

De voorstelling, die op de eenvoudigste wijze het gedrag der amylasen verklaren kan, is m.i. deze, dat het α -zetmeel enkel α -glucosidische bindingen bevat, het β -zetmeel afwisselend een α - en een β -binding. In de onderstaande formules is dit schematisch aangegeven.



De horizontale strepen stellen de glucose-resten voor, de pijlen geven de bindingen aan, welke worden gehydrolyseerd. Zooals men ziet kan uit α -zetmeel direct α -maltose ontstaan, terwijl de β -amylase op deze component niet kan inwerken.



In de formule voor β -zetmeel geven de getrokken pijltjes de werking van β -moutamylase aan, daarbij ontstaat direct β -maltose. Het β -zetmeel is echter wellicht ook aantastbaar voor α -moutamylase; deze veronderstelling hebben wij reeds als een mogelijke verklaring voor het overschrijden der afbraakgrens naar voren gebracht. Door de gestippelde pijltjes is deze werking aangeduid; zooals men ziet zou daarbij de α -vorm van een β -disaccharide ontstaan. Een dergelijke suiker, bekend als „isomaltose” of „dextrinose” schijnt door verschillende onderzoekers verkregen te zijn ¹⁾.

Tenslotte moge worden vermeld, dat LING en NANJI (l.c.), wat

1) Zie hieromtrent: PRINGSHEIM, Die Polysaccharide, pag. 236 e.v.

de structuur der zetmeelcomponenten betreft, tot een andere voorstelling komen, dan die, welke hier is aangegeven. „Amylose”, ons β -zetmeel, zou volgens hen enkel α -bindingen bevatten, „ α - β -hexa-amylose”, ons α -zetmeel, afwisselend een α - en een β -binding, zooals de naam reeds aanduidt. Onze ervaring, dat α -zetmeel door β -mout-amylose niet wordt gehydrolyseerd, pleit niet voor een dergelijke structuur; bovendien blijkt uit hun eigen onderzoekingen, dat „ α - β -hexa-amylose” wél door maltase (α -glucosidase), maar niet door emulsine (β -glucosidase) wordt aangetast.

Zoo zien wij dus dat, terwijl bij maltose en andere eenvoudige glucosiden de resultaten van het polarimetrisch onderzoek en van de enzymatische analyse in dezelfde richting wijzen, bij het zetmeel een tegenstrijdigheid blijft bestaan. Het wil mij echter voorkomen dat wij, bij een zoo gecompliceerd gebouwde stof als het zetmeel, waarvan de structuur nog niet tot in bijzonderheden bekend is (b.v. wat den aard der zuurstofringen betreft), aan de resultaten van de *enzymatische analyse* de grootste beteekenis mogen toekennen.

VIII

SAMENVATTING ¹⁾

Uitgangspunt van het onderzoek vormde de dissertatie van H. P. WIJSMAN: „De diastase, beschouwd als mengsel van maltase en dextrinase”. In overeenstemming met WIJSMAN werd gevonden, dat de aanwezigheid van twee amylasen in gerstemout door middel van diffusie in zetmeelhoudende gelatine kan worden aangetoond (fig. 1). Om het verschijnsel duidelijk te zien te krijgen bleek het gewenscht, de diffusie bij lage temperatuur (5—10° C.) te laten verlopen.

De beide amylasen, in de literatuur bekend als „zetmeeloplosgend”- of „dextrinevormend” enzym en „suikervormend” enzym werden op grond van hun gedrag α -moutamylase en β -moutamylase genoemd.

Uit een waterig moutextract werd de amylase met alcohol in twee fracties neergeslagen; een eerste fractie, welke uitvlokte met alcohol tot 60 % en een tweede, die uitvlokte tusschen 60 en 80 %. Uit de eerste fractie werd door verwarming op 70° C. gedurende 15 min. en neerslaan met alcohol tot 60 % een droog praeparaat van α -moutamylase gemaakt. De tweede fractie diende als praeparaat van α - β -moutamylase, het mengsel der beide enzymen. Een droog praeparaat van β -moutamylase werd bereid door geparelde gerst (parelgort) met 50 % alcohol te extraheeren en vervolgens met alcohol tot 80 % neer te slaan.

Als substraat diende „oplosbaar zetmeel”, uit aardappelmeel bereid volgens een eenigszins gemodificeerde methode van LINTNER. Van beide amylasen werd het verloop van de werking bestudeerd

1) Een beknopte beschrijving der belangrijkste proeven is reeds gepubliceerd in Proc. Kon. Acad. v. Wetensch. Amst. **34**, 893 (1931).

met de methode der quantitatieve suikerbepaling volgens SCHOORL. De pH-bepalingen geschieden colorimetrisch, als bufferstof werden mengsels van sec. Na-citraat met NaOH of HCl gebruikt. Alle reacties vonden plaats bij een temperatuur van 40° C.

Bij de bestudeering van de eigenschappen der enzympraeparaten werd het volgende vastgesteld.

1. De β -moutamylase vertoont haar grootste activiteit tussen pH 4,55 en 5,15 (fig. 2). Haar werking wordt door β -maltose sterker geremd dan door α -maltose. Bij geringe enzymconcentratie heeft de reactie aanvankelijk een rechtlijnig verloop, de afwijking daarvan bij gebruik van hogere concentraties kan aan de remmende werking van de gevormde maltose worden toegeschreven. De beginsnelheid van de reactie is nagenoeg evenredig met de enzymconcentratie. Onafhankelijk van de enzymconcentratie komt de reactie bij de vorming van ca. 64 % van de theoretisch mogelijke hoeveelheid maltose uit een zetmeeloplossing van 1 % tot stilstand (fig. 4). De jodiumreactie blijft daarbij steeds bestaan.

Het restproduct, de erythrogranulose van WIJSMAN, wordt met alcohol uit het reactiemengsel neergeslagen. Het blijkt geen reducerend vermogen te bezitten en kleurt zich met jodium blauw of paars al naar de relatieve hoeveelheid jodium, die toegevoegd wordt.

2. De α -moutamylase vertoont met erythrogranulose als substraat een gebied van optimale activiteit tussen pH 5,65 en 5,85. De kromme heeft aan de alkalische zijde daarvan een veel steiler verloop dan bij β -moutamylase (fig. 2). Met oplosbaar zetmeel als substraat ontstaat dezelfde kromme, waaruit blijkt, dat het enzympraeparaat geen β -moutamylase meer bevat. De werking van α -moutamylase wordt door α -maltose sterker geremd dan door β -maltose. De beginsnelheid van de reactie is evenredig met de enzymconcentratie wanneer deze laatste gering is. Bij verhooging van de enzymconcentratie verschuift de grens van de afbraak, echter treedt in de nabijheid van 36 % een sterke remming op. Gebruikt men een enzymoplossing, die gedurende 15 minuten op 70° C. verwarmd was, dan worden ca. 36 % maltose met groote snelheid gevormd, waarna de reactie langzaam verder gaat, onder omstandigheden tot 78 % toe (fig. 5). De jodiumreactie verdwijnt bij de werking van dit enzym snel.

3. De α - β -moutamylase geeft met oplosbaar zetmeel als substraat een pH-kromme met een optimum bij 5,30 en een zeer langzame daling naar de alkalische zijde. Met erythrogranulose ligt het optimum bij pH 5,75, terwijl de kromme in dit geval een even steile daling vertoont als die van de α -moutamylase (fig. 3), waaruit volgt, dat dit enzym reeds als zoodanig in het mengsel voorkomt. Een quantitative versuikering kan met dit mengsel niet worden verkregen, in totaal wordt 78—80 % van de theorie maltose gevormd.

Uit de literatuur bleek, dat het evenwichtsmengsel van α - en β -maltose en van α - en β -glucose 36 % van de α -vorm bevat naast 64 % van de β . De afbraakgrenzen van de beide moutamylasen werden hiermee in verband gebracht en de meening werd uitgesproken, dat de zetmeeloplossing een evenwichtsmengsel voorstelt van 36 % α -zetmeel naast 64 % β -zetmeel. De erythrogranulose is dus α -zetmeel en wordt alleen door α -amylasen aangetast. Aangezien in het dierlijk lichaam en in schimmels alleen α -amylasen voorkomen, kunnen wij in die organismen enkel α -zetmeel verwachten, daar deze component zeer moeilijk in de β -vorm overgaat. Inderdaad blijkt het „dierlijk zetmeel”, glycogeen, in vele opzichten overeen te komen met erythrogranulose; beide stoffen gedragen zich op dezelfde wijze ten opzichte van de beide moutamylasen (fig. 6) en zij bezitten nagenoeg hetzelfde specifieke draaiingsvermogen. In de groene plant, waarin de beide zetmeelcomponenten naast elkaar voorkomen, vindt men ook steeds een mengsel van α - en β -amylase. Verder blijkt uit een onderzoek van R. KUHN, dat ook bij de werking van andere α -amylasen, dan α -moutamylase, een remming in de nabijheid van 36 % optreedt (fig. 8).

Tenslotte werden beide zetmeelcomponenten voorgesteld als ketens van glucosidisch gebonden glucose-resten, waarbij in het α -zetmeel slechts α -glucosidische bindingen voorkomen, terwijl het β -zetmeel afwisselend een α - en een β -glucosidische binding bevat.

STELLINGEN

I

De draaiing van de sporangiëndragers van *Phycomyces* staat niet in direct verband met den groei van deze organen.

A. J. P. OORT, Proc. Kon. Acad. v. Wetensch. A'dam, **34**, 564 (1931).

II

Het is in het algemeen niet geoorloofd de grootte der deeltjes bij lyophiele solen te berekenen met behulp van de formule van VON SMOLUCHOWSKY.

H. R. KRUYT en H. J. C. TENDELOO, Koll. Beih. **29**, 413 (1929).

III

Tegen de bepalingen van de dichtheid van anorganische zouten, uitgevoerd door WULFF en HEIGL, zijn ernstige bezwaren te bedenken.

P. WULFF en A. HEIGL, Zeitschr. phys. Chem. **153**, 187 (1931).

IV

Het is niet waarschijnlijk, dat het lupinine uit een mengsel van twee isomeren bestaat.

K. WINTERFELD en F. W. HOLSCHNEIDER, Ber. **64**, 137, 692 (1931).

P. KARRER, Ber. **64**, 942 (1931).

G. A. VAN KLINKENBERG

V

Het is niet waarschijnlijk, dat het „trihexosaan” een trisaccharide-anhydride voorstelt.

H. PRINGSHEIM, *Die Polysaccharide*, pag. 205 (1931).

VI

De gedragingen der vrije radicalen van het type triphenylmethyl kunnen het volledigst verklaard worden met behulp van het principe der geïnduceerde, afwisselende polariteit van ROBINSON, KERMACK en LAPWORTH.

VII

Aan de bepaling van het moleculairgewicht van vitamine-A door BRUINS, OVERHOFF en WOLFF kan niet een groote waarde worden toegekend.

H. R. BRUINS, J. OVERHOFF en L. K. WOLFF, *Biochem. Journ.* **25**, 430 (1931).

VIII

De beteekenis van de experimenteele wetenschappen voor de ontwikkeling van den menschelijken geest wordt door de meeste cultuurhistorici onderschat.



diss

Rijksasyl voor Psychopaten
te Avereest,