

## Amylasen und ihre Wirkung

Von Prof. Dr. KURT H. MEYER, Genf

Laboratorien für organische und anorganische Chemie der Universität Genf

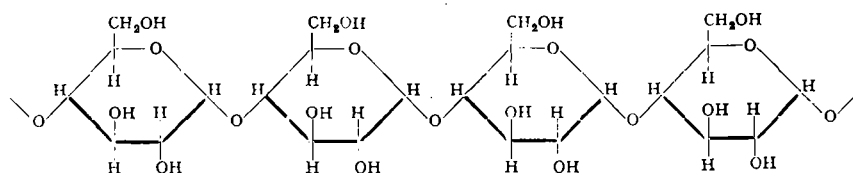
Verschiedene  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylasen können rein hergestellt werden. Ihre Wirkung auf die Hauptbestandteile der Stärke, Amylose und Amylopektin, die gleichfalls rein dargestellt werden konnten, wird beschrieben. Dabei wird besonders die Struktur des Stärkekornes berücksichtigt.

### 1. Einleitung

1831 fand Leuchs<sup>1)</sup>, daß Speichel Stärkekleister verflüssigt und dabei Zucker erzeugt; zwei Jahre später stellten Payen und Persoz<sup>2)</sup> aus Malz eine feste, amorphe Substanz her, die rasch die Hüllen von gequollenen Stärkekörnern vom Inhalt trennte und deswegen „Diastase“ (von „Diastasis“ Abtrennung) genannt wurde.

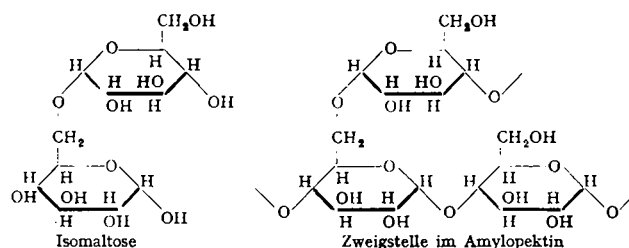
Mit diesen Arbeiten beginnt die wissenschaftliche Enzymologie, in der Untersuchungen über stärke-spaltende Enzyme, die man heute meist als Amylasen bezeichnet, einen breiten Raum eingenommen haben, was sich durch ihre große biologische und technische Bedeutung erklärt. Insbes. sind die durch die enzymatische Stärkespaltung entstehenden Produkte, Zucker und Dextrine, sowie die Kinetik der Spaltung viel bearbeitet worden. Nun ist aber in den meisten dieser Arbeiten die Vielheit der Faktoren, die die Reaktion bestimmen, nicht genügend berücksichtigt worden. Es ist z. B. schon lange bekannt, daß das Malz zwei Enzyme enthält, die Stärke in ganz verschiedener Weise angreifen. Weiter weiß man, daß die Wirkung der Amylasen von allerhand Zusätzen, die als „Aktivatoren“ oder als „Hemmstoffe“ wirken, beeinflusst wird. Man wird daher Versuche, die zu einwandfreien Schlüssen führen sollen, am besten mit ganz reinen, möglichst kristallisierten Enzymen anstellen. Diese sind aber erst seit kurzem zugänglich; über ihre Darstellung und über Arbeiten mit ihnen wird im folgenden berichtet.

Aber nicht nur die Enzyme, auch das Substrat, die Stärke, trägt das ihre dazu bei, die Kinetik des Abbaus zu komplizieren. Stärke ist nämlich nicht, wie auch heute noch viele Chemiker annehmen, eine einheitliche chemische Substanz. Wie wir vor zehn Jahren fanden<sup>3)</sup>, enthalten die gebräuchlichen Stärken als Hauptbestandteile zwei Polysaccharide oder besser Gruppen von Polysacchariden, die sich in ihrer Konstitution und in ihrem physikalischen und chemischen Verhalten erheblich voneinander unterscheiden. Dies sind: erstens ein unverzweigtes Polysaccharid oder besser eine Mischung unverzweigter Polysaccharide, in denen 100–2000 Glucose-Reste durch  $\alpha$ -1-4-Bindungen, wie sie auch in der Maltose vorkommen, zu Ketten verschiedener Länge vereinigt sind



Formel der Amylose

und zweitens ein stark verzweigtes, dessen Zweige an die C-Atome 6 durch  $\alpha$ -1-6-Bindungen, „Isomaltose-Bindungen“, angeheftet<sup>4, 5)</sup> sind.



Andere Zweigbindungen sind nicht vorhanden<sup>6)</sup>.

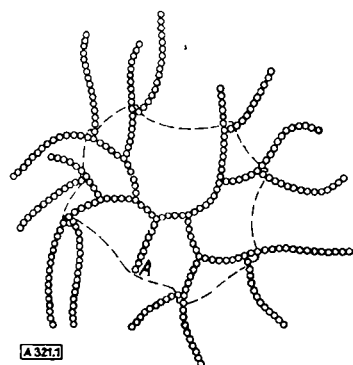


Bild 1

Schema der Verzweigung des Amylopektins, o = Glucosereste,  
— — — umfaßt Grenz-dextrin  
A = aldehydische Endgruppe

Für ersteres schlugen wir den alten, aber bisher in anderem Sinne gebrauchten Namen „Amylose“, für das zweite den ebenfalls schon gebrauchten Namen „Amylopektin“ vor. Beide Substanzen werden von Amylasen angegriffen, aber in verschiedener Weise, so daß sich diese Reaktionen beim Stärkeabbau überlagern. Man wird also den Abbau der reinen Amylose und den des reinen Amylopektins getrennt studieren müssen, um den komplizierten Abbau der Stärke verstehen zu können.

Im allgem. wird nun nicht eine wirkliche Lösung von Stärkebestandteilen, sondern der sog. „Kleister“ dem Abbau unterworfen. Im Kleister ist aber die morphologische Struktur des Kornes noch mehr oder weniger erhalten, und man wird daher auch sie berücksichtigen müssen, um ein klares Bild vom Vorgang des diastatischen Stärkeabbaus zu erhalten.

<sup>1)</sup> Poggendorffs Ann. d. Phys. Chem. 22, 623 [1831].

<sup>2)</sup> Ann. Chim. Phys. 53, 73 [1833].

<sup>3)</sup> K. H. Meyer, Naturwiss. 28, 397 [1940]; Adv. Colloid. Sci. 1, 143 [1942].

<sup>4)</sup> K. Freudenberg u. H. Boppel, Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 609 [1940].

<sup>5)</sup> W. N. Haworth, E. L. Hirst u. F. A. Isherwood, J. Chem. Soc. [London] 1937, 577.

<sup>6)</sup> G. C. Gibbons u. R. A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta 33, 1477 [1950].

## 2. Darstellung kristallisierter Amylasen

In der Wahl der Methoden zur Anreicherung und Reindarstellung ist man noch auf Herumprobieren angewiesen; fraktionierte Fällungen bei 0° mit Säure, Aceton, Ammonsulfat oder anderen Salzen, ferner Erwärmungs- oder Schütteldenaaturierung zur Entfernung störender Proteine und andere Kunstgriffe werden angewandt. Bei jedem Schritt wird die Anreicherung durch Analyse des N-Gehaltes und der enzymatischen Aktivität kontrolliert, und es wird auf Einheitlichkeit elektrophoretisch geprüft. Ist letztere erreicht, so setzen geduldige Versuche zur Kristallisation ein, und schließlich wird durch mehrfaches Umkristallisieren das Enzym gereinigt.

$\beta$ -Amylasen, von R. Kuhn<sup>7)</sup> so genannt, weil sie Maltose in der niedrig drehenden  $\beta$ -Form in Freiheit setzen, greifen nach Ohlsson<sup>8)</sup> die Polysaccharide der Stärke von den nichtaldehydischen Enden aus an; sie bilden dabei sofort Maltose. Sie sind nur in Pflanzen nachgewiesen worden: im Malz, in Bataten, in Sojabohnen. Aus Bataten (*Ipomoea batatas*, sweet potato) hat

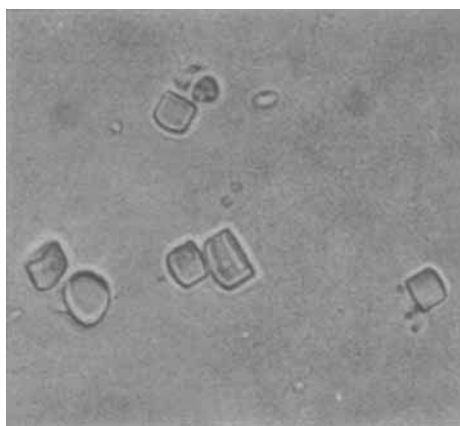


Bild 2.  $\beta$ -Amylase aus Malz ( $\times 900$ )

Balls<sup>9)</sup> 1946 die erste kristallisierte Amylase ( $\beta$ -Amylase) erhalten; die Reinigung und Kristallisation der viel länger bekannten  $\beta$ -Amylase des Malzes ist erst kürzlich im Genfer Arbeitskreis gelungen<sup>10)</sup> (Bild 2).

In einem Gemisch von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylase, wie es im Malz vorliegt, kann man erstere durch 24-stündige Behandlung mit Säure ( $p_H$  3,5) in der Kälte völlig zerstören; aus diesem Produkt wurde durch vielfaches fraktioniertes Umfällen die reine  $\beta$ -Amylase hergestellt.

$\alpha$ -Amylasen, so genannt, weil die freien Aldehyd-Gruppen in der hochdrehenden  $\alpha$ -Form in Freiheit gesetzt werden, spalten

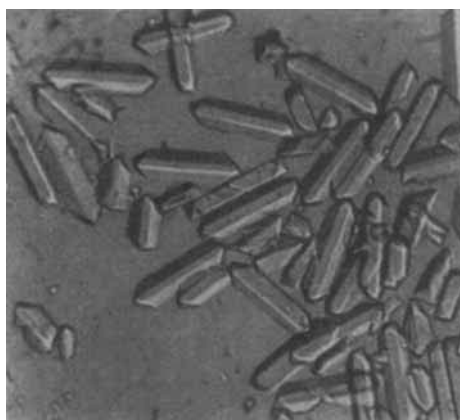


Bild 3.  $\alpha$ -Amylase aus Schweinepankreas ( $\times 170$ )

die Stärkepolysaccharide zunächst in größere Bruchstücke, dann in Oligosaccharide, Maltose und Glucose.

Zunächst erhielten wir Schweinepankreas-Amylase in schönen Kriställchen<sup>11, 12)</sup> (Bild 3); weiter wurden kristallisiert

<sup>7)</sup> Liebigs Ann. Chem. 443, 1 [1925].

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 189, 17 [1930].

<sup>9)</sup> J. biol. Chemistry 163, 571 [1946].

<sup>10)</sup> Ed. H. Fischer, K. H. Meyer, G. Noelting u. A. Piguet, Arch. Biochem. 27, 235 [1950].

<sup>11)</sup> K. H. Meyer, Ed. H. Fischer u. P. Bernfeld, Experientia 2, 362 [1946]; 3, 106 [1947].

<sup>12)</sup> Ed. H. Fischer u. P. Bernfeld, Helv. Chim. Acta 31, 1831 [1948].

erhalten die „Ptyalin“ genannte  $\alpha$ -Amylase des menschlichen Speichels<sup>13)</sup> (Bild 4) sowie menschliche Pankreasamylase<sup>14, 15)</sup> (Bild 5).

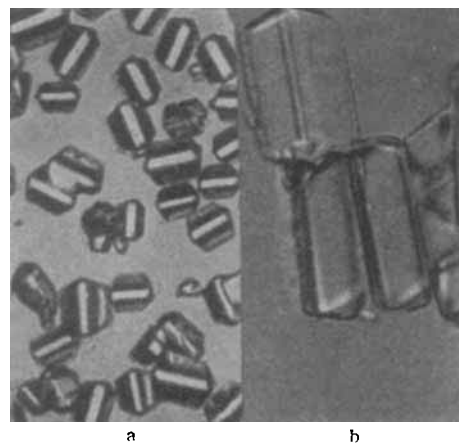


Bild 4  
 $\alpha$ -Amylase aus menschlichem Speichel. a = 200  $\times$ ; b = 730  $\times$

Beide sind voneinander nicht zu unterscheiden, aber von Schweinepankreas-Amylase deutlich verschieden, so daß wir annehmen, daß es nur eine menschliche Amylase gibt. Die Art, nicht das Organ<sup>16)</sup> des Lebewesens, bestimmt also die Zusammensetzung des Enzyms.

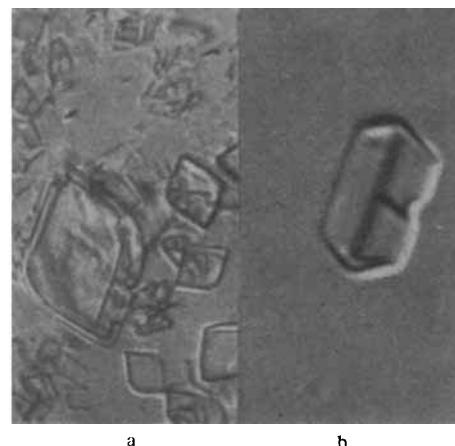


Bild 5  
 $\alpha$ -Amylase aus menschlichem Pankreas. a = 910  $\times$ ; b = 730  $\times$

Von pflanzlichen  $\alpha$ -Amylasen sind die  $\alpha$ -Amylase des Malzes von Schwimmer und Balls<sup>16)</sup> (Bild 6) und  $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus*

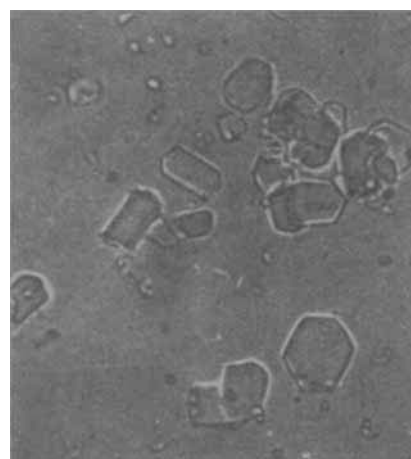


Bild 6  
 $\alpha$ -Amylase aus Malz (350  $\times$ )

<sup>13)</sup> K. H. Meyer, Ed. H. Fischer, A. Staub u. P. Bernfeld, ebenda 31, 2158 [1948].

<sup>14)</sup> K. H. Meyer, Ed. H. Fischer, P. Bernfeld u. F. Duckert, Arch. Biochem. 18, 203 [1948].

<sup>15)</sup> Ed. H. Fischer, F. Duckert u. P. Bernfeld, Helv. Chim. Acta 33, 1060 [1950].

<sup>16)</sup> J. biol. Chemistry 176, 465 [1948].

	$\beta$ -Amylasen aus		$\alpha$ -Amylasen aus				
	Bataten <sup>a)</sup>	Malz <sup>b)</sup>	Malz <sup>c)</sup>	Bacillus <sup>d)</sup> subtilis	Schweine <sup>e)</sup> Pankreas	Menschl. <sup>f)</sup> Pankreas	Menschl. <sup>g)</sup> Speichel
Aktivität* pro mg N. ....	250 <sup>h)</sup>	1660	2350	3600	4000	6200	6200
Aktivität pro mg Enzym .....	378 <sup>n)</sup>	235	315	500	630	980	980
% N .....	15,1	14,1	13,4	14	15,8	15,8	15,8
% P .....			<0,01		<0,05	0,01	0,01
% S .....			<0,05 <sup>l)</sup>	0	0	0	0
SH-Gruppen .....	—	+	— <sup>l)</sup>	—	—	—	—
pH-Optimum .....	4–5	4,7–5,3	4,7–5,4 <sup>l)</sup>	5,3–6,8	6,9	6,9	6,9
pH-Stabilität .....		4,0–8,0	4,9–9,1 <sup>l)</sup>	4,8–8,5	7–8,5	4,8–11	4,8–11
% Löslichkeit bei 2° pH 7 .....		>15	>15	6	0,6	0,3	0,3
Michaelis-Konst. (g/100 cm <sup>3</sup> ) <sup>j)</sup> .....			>0,06	0,063	0,018		
Aktivierungswärme .....		15300	7030 <sup>l)</sup>			16500	16500
Molekulargewicht .....	152000 <sup>m)</sup>		59500		45000 <sup>h)</sup>		
Turnover number <sup>k)</sup> .....	53000 <sup>n)</sup>		17000		25000		
Elektrophoret. Mobilität (pH 7,9 $\mu$ = 0,1) U · 10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> · volt <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> .....		1,8	3,1 <sup>l)</sup>	3,1	3,1	3,2	3,2
Isoelektr. Punkt .....	4,77 <sup>n)</sup>	6,0	5,7 <sup>l)</sup>		5,2–5,6	5,2–5,6	5,2–5,6
Absorptionsspektrum Maximum (m $\mu$ ) .....		280	280	280	280	280	280
Wendepunkt .....			292	292	292	292	292
Aktivierung durch Cl <sup>-</sup> .....	—	—	—	+	—	—	+
Aktivierung durch Ca <sup>2+</sup> .....	—	—	+	—	—	—	—
Verhältnis Saccharogene Dextrinogene Wirkung ( $\pm 0,2$ ) <sup>l)</sup> .....	61	62	9,8	9,8	9,8	9,6	9,6

Tabelle 1. Eigenschaften der kristallisierten Amylasen

- \* Die Aktivität ist gegeben durch die Menge (in mg) freigesetzter Maltose, wenn man 1 cm<sup>3</sup> Enzymlösung auf 1 cm<sup>3</sup> 1proz. Zulkowski-Stärke-Lösung bei 20°, während 3 min, beim pH-Optimum des Enzyms einwirken läßt.
- <sup>a)</sup> A. K. Balls, R. L. Thompson u. M. K. Walden, J. biol. Chemistry 163 571 [1946]; 173, 9 [1948].
- <sup>b)</sup> Ed. H. Fischer, K. H. Meyer, G. Noelting, A. Piguet, Arch. Biochem. 27, 235 [1950]; K. H. Meyer, Ed. H. Fischer u. A. Piguet, Helv. Chim. Acta, im Druck.
- <sup>c)</sup> S. Schwimmer u. A. K. Balls, J. biol. Chemistry 179, 1063 [1949].
- <sup>d)</sup> K. H. Meyer, M. Fuld u. P. Bernfeld, Experientia 3, 411 [1947] u. unveröffentlichte Resultate.
- <sup>e)</sup> K. H. Meyer u. P. Bernfeld, Helv. Chim. Acta 30, 611 [1947]; Ed. H.

- Fischer u. P. Bernfeld, ebenda 31, 1831 [1948].
- <sup>f)</sup> Ed. H. Fischer, F. Duckert u. P. Bernfeld, ebenda 33, 1060, 1064 [1950].
- <sup>g)</sup> K. H. Meyer, Ed. H. Fischer, A. Staub u. P. Bernfeld, ebenda 31, 2158, 2165 [1948].
- <sup>h)</sup> C. E. Danielsson, Nature 160, 899 [1947].
- <sup>i)</sup> K. H. Meyer, Ed. H. Fischer u. C. H. Haselbach, Helv. Chim. Acta, im Druck.
- <sup>j)</sup> P. Bernfeld u. H. Studer-Pécha, ebenda 30, 1904 [1947].
- <sup>k)</sup> Zahl der gespaltenen glukosidischen Bindungen pro min. und Enzymmolekel.
- <sup>l)</sup> P. Bernfeld u. M. Fuld, Helv. Chim. Acta 31, 1423 [1948].
- <sup>m)</sup> S. Englard u. Th. P. Singer, J. biol. Chemistry 187, 213 [1950].
- <sup>n)</sup> nach eigenen Versuchen.



Bild 7  
 $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus subtilis* ( $\times 85$ )

*subtilis* (Bild 7) (aus technischer „Biolase“ isoliert) von uns rein und kristallisiert erhalten worden<sup>17)</sup>. Tabelle 1 gibt eine Zusammenstellung der Eigenschaften dieser Enzyme. Als letzte der  $\alpha$ -Amylasen ist kürzlich die sog. Takadiastase aus *Aspergillus oryzae* von Ed. H. Fischer und R. de Montmollin in Genf kristallisiert erhalten worden.

### 3. Reindarstellung von Amylose und Amylopektin

Es läßt sich keine für alle Stärkesorten gültige Vorschrift zur Abtrennung beider Komponenten geben; die Einzelheiten müssen für jede Art ausprobiert werden. In jedem Fall ist es zweckmäßig, niedermolekulare (Amylose A<sub>1</sub>) und hochmolekulare Amylose (A<sub>2</sub>) getrennt darzustellen. Bei der großen Bedeutung der Kartoffelstärke halten wir es für nützlich, im folgenden eine Methode zur Aufarbeitung der Kartoffelstärke anzugeben<sup>18, 19)</sup>. In ihr wird von der wichtigen Beobachtung Schochs<sup>20)</sup> Gebrauch gemacht, daß Amylose durch Alkohol mit mehr als 3 Kohlenstoffatomen ausfällbar ist.

- <sup>17)</sup> K. H. Meyer, M. Fuld u. P. Bernfeld, Experientia 3, 411 [1947].
- <sup>18)</sup> K. H. Meyer u. P. Rathgeb, Helv. Chim. Acta 31, 1533 [1948].
- <sup>19)</sup> K. H. Meyer u. G. C. Gibbons, ebenda 33, 210 [1950].
- <sup>20)</sup> Cereal Chem. 18, 127 [1941]; Adv. Carbohydrate Chem. 1, 247 [1945].

50 g Kartoffelstärke werden in wenig Wasser suspendiert und in heißes destilliertes Wasser einfließen gelassen. Die geeignete Wassertemperatur muß durch Vorversuche ermittelt werden, da die Körner im Laufe von etwa 1/4 Stunde möglichst quellen, aber nicht platzen sollen und die optimale Temperatur (meistens innerhalb 65–70°) von Alter und Vorbehandlung der Stärke abhängt. Durch mikroskopische Prüfung der Suspension muß kontrolliert werden, ob die Körner noch intakt sind, da andernfalls die Amylose A<sub>1</sub> nicht rein erhalten wird. Die heiße Suspension wird eine Stunde langsam gerührt, dann abgekühlt und zentrifugiert. Die abzentrifugierten gequollenen Körner werden im Wasser aufgeschlämmt und erneut abzentrifugiert. Die vereinigten Flüssigkeiten werden bei vermindertem Druck auf 500 cm<sup>3</sup> eingedampft und dann in 1200 cm<sup>3</sup> Methanol eingegossen. Der Niederschlag (Amylose A<sub>1</sub>) wird gut mit Alkohol und trockenem Äther gewaschen. Die abzentrifugierten Körner werden in 3 l Wasser suspendiert und 2 h auf 110° erhitzt (oder 2–3 Mal abwechselnd 30 min auf 100° erhitzt und dann mit einem „Waring Blender“ 10 min so heftig gerührt, daß alle Körner zerstört werden, was die Auflösung erleichtert). Die Lösung, aus der Spuren ungelösten Materials durch Zentrifugieren (in der Kälte) entfernt werden, wird auf 90° erwärmt und unter heftigem Rühren Cyclohexanol im Überschuß zugefügt. Auch während des Abkühlens, das ca. 10 h dauern soll, wird weiter heftig gerührt. Nach 48 h bei 5° ist die Abscheidung des Additionsprodukts Amylose A<sub>2</sub>-Cyclohexanol beendet, es wird aufgerührt und zentrifugiert. Der Niederschlag wird mit Wasser, gesättigt mit Cyclohexanol, gewaschen und in 1500 cm<sup>3</sup> kochenden, mit Cyclohexanol gesättigten Wassers suspendiert und wie oben abgekühlt und weiter behandelt. Der so umkristallisierte Niederschlag wird mit Wasser, gesättigt mit Cyclohexanol, gewaschen, darauf mit Alkohol und Äther.

Zur Reindarstellung des Amylopektins wird aus der Mutterlauge das Cyclohexanol unter vermindertem Druck abgedampft und die Lösung auf 3 l (d. i. auf etwa 1%) mit Wasser verdünnt. 4 g Stearinsäure werden in wenig heißem Alkohol gelöst und unter heftigem Rühren, das 1 h fortgesetzt wird, zur Lösung zugefügt. Die ausgefällte Stearinsäure, die die letzten, sonst sehr schwer zu entfernenden Reste Amylose mitgerissen hat, wird abfiltriert und die Lösung in dünnem Strahl in das doppelte Volumen Aceton einfließen gelassen; der feinpulvrige Niederschlag reinen Amylopektins wird mit Alkohol und Äther gewaschen.

### 4. Analyse des durch enzymatische Spaltung erhaltenen Gemisches

Den Abbau der Polysaccharide verfolgt man vor allem durch quantitative Bestimmung der durch Spaltung freigewordenen Aldehyd-Gruppen, sei es durch Titrieren mit Jod nach Willstätter-Schudel, oder durch Oxydation mit Fehlingscher Lösung nach Bertrand, oder mit der kolorimetrischen Bestimmung mit Hilfe von Dinitrosalizylsäure<sup>21)</sup>. Die Spaltprodukte bestehen aus

<sup>21)</sup> G. Noelting u. P. Bernfeld, Helv. Chim. Acta 31, 286 [1948].

Polysacchariden mittleren und niederen Molekulargewichtes (Dextrinen) einschließlich Maltotetraose, Maltotriose und verzweigten Tri- und Tetrasacchariden, ferner aus Maltose, Isomaltose und Glucose.

Um sie nebeneinander zu bestimmen, bedient man sich zweckmäßig der von *Kluyver*<sup>22)</sup> und *Smits van Waesberge*<sup>23)</sup> angegebenen Methode der auswählenden Vergärung der Zucker durch besondere Hefearten<sup>24)</sup>. Die Amylase wird durch Erhitzen abgetötet und dann *Torula monosa*<sup>24)</sup> zugesetzt; sie vergärt nur Glucose. Aus der Bestimmung des Reduktionswertes vor und nach Vergärung erhält man durch Differenzbildung den Glucosegehalt. Dann wird *Saccharomyces Chodatii*<sup>25)</sup> zugesetzt, wodurch nur Glucose und Maltose, sehr viel langsamer auch Isomaltose vergärt werden.

Was übrig bleibt, sind also Tri-, Tetra- und höhere Saccharide, meist „Dextrine“ genannt. Ihre molekulare Konzentration wird in einer Probe durch den Reduktionswert ermittelt, da ja jede Dextrinmolekel eine reduzierende Gruppe enthält. In einer zweiten Probe wird durch Kochen mit 2 nHCl alles zu Glucose hydrolysiert und der Gehalt an Glucose reduktometrisch ermittelt. Auf diese Weise erhält man die Gewichtskonzentration des Dextrins, und aus dieser in Verbindung mit der molekularen Konzentration seinen mittleren Polymerisationsgrad.

Außer fortlaufenden reduktometrischen Messungen des Spaltungsgrades werden von Zeit zu Zeit Gesamtanalysen nach dieser Methode ausgeführt.

## 5. Bisherige Resultate an Stärke

Durch  $\beta$ -Amylase wird Stärke bis zu einem hochmolekularen Grenzdextrin abgebaut; daneben entstehen ca. 60 % Maltose. Es würde viel zu weit führen, würden wir die Resultate der früheren, überaus zahlreichen Arbeiten über den  $\alpha$ -amylatischen Stärkeabbau aufzählen. Als wesentlichstes Ergebnis wurde gefunden, daß etwa 80 % der Stärke in vergärbare Zucker verwandelt werden, während etwa 20 % unvergärbbar sind. Doch nimmt der unvergärbare Anteil erheblich ab, wenn die Abbauprodukte der gleichzeitigen Wirkung von Hefe und Amylase ausgesetzt werden.

Die nicht vergärbaren „Dextrine“ enthalten hauptsächlich verzweigte Oligosaccharide, wie u. a. *Montgomery*<sup>26)</sup> durch Isolierung der Isomaltose sowie *Myrbäck*<sup>27)</sup> in vielen Arbeiten gezeigt haben. Letzterer konnte auch zeigen, daß die Affinität der Amylasen zu Stärke und ihren Abbauprodukten um so geringer ist, je niedriger das Molekulargewicht der letzteren ist. Damit erklärt *Myrbäck* die Tatsache, daß die Spaltgeschwindigkeit im Laufe des Abbaus immer geringer und schließlich unmeßbar klein wird.

Wie nämlich allgemein heute angenommen wird, wird die Spaltgeschwindigkeit durch zwei Faktoren bestimmt: die Konzentration der Verbindung Enzym-Substrat (hier also: Amylase-Polysaccharid) und die Zerfallsgeschwindigkeit dieser Verbindung. ES, die Konzentration der Verbindung, hängt nun nach dem Massenwirkungsgesetz von der Affinitätskonstante K und den Konzentrationen beider Partner, Enzym E und Substrat S ab:

$$K = \frac{ES}{(E-ES) \cdot (S-ES)}$$

Wenn nun K mit fallendem Polymerisationsgrad des vorhandenen Substrats absinkt, so muß die Spaltgeschwindigkeit fortlaufend abnehmen, da ja der Polymerisationsgrad durch die Spaltung dauernd verringert wird.

## 6. Die Wirkung von $\beta$ -Amylase auf Amylose und Amylopektin

Amylose wird bei geeignet geleiteter Reaktion durch  $\beta$ -Amylase völlig abgebaut<sup>28, 29)</sup>. Aus Amylopektin entsteht hingegen neben 60 % Maltose ein hochmolekulares „Grenzdextrin“, das mit Jod eine rotviolette Farbreaktion gibt.

<sup>22)</sup> Biochem. Suikerbepalingen, Leiden, 1914.

<sup>23)</sup> These, Delft, 1941.

<sup>24)</sup> Aus der Sammlung des Centraalbureau voor Schimmelculturen, Delft (Prof. A. J. Kluyver).

<sup>25)</sup> Aus der Sammlung des Institut de Botanique der Universität Genf (Prof. F. Chodat).

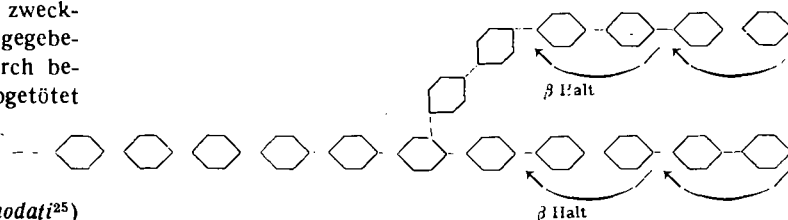
<sup>26)</sup> J. Amer. Chem. Soc. 69, 2249 [1947].

<sup>27)</sup> Adv. Carbohydrate Chem. 3, 252 [1948].

<sup>28)</sup> M. Samec u. E. Waldschmidt-Leitz, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 203, 16 [1931].

<sup>29)</sup> P. Bernfeld u. P. Gürtler, Helv. Chim. Acta 31, 106 [1948].

Die Erklärung ist recht einfach. Das Enzym kann die unverzweigte Amylose vom nicht aldehydischen Ende aus vollkommen abbauen, wird aber durch die Zweigstellen des Amylopektins gehemmt.



Wirkung der  $\beta$ -Amylase auf Amylopektin

Es ließ sich nämlich zeigen, daß alle „Endgruppen“ und damit auch alle „Zweigstellen“ des Amylopektins noch im Abbauprodukt, dem „Grenzdextrin“ vorhanden sind; das Enzym hat also nur die äußeren langen Zweige abbauen können. Das „Grenzdextrin“ ist in Bild 1 schematisch angegeben.

Falls hohe Enzymkonzentrationen angewandt werden, wird Amylopektin viel rascher angegriffen als Amylose<sup>30)</sup>, denn in einer Amylopektin-Lösung ist infolge der Verzweigung die Konzentration der Endgruppen, an denen die Reaktion einsetzt, viel größer als bei einer gleichkonzentrierten Amylose-Lösung. Bei geringen Enzymkonzentrationen macht sich das „Altern“<sup>(29, 31, 32)</sup> oder „Retrogradieren“ der Amylose, bzw. Amylopektin-Lösung, bemerkbar; die Lösungen assoziieren und bilden submikroskopische Aggregate, die enzymresistent sind; durch „Verjüngen“, d. h. Alkalizusatz werden diese wieder aufgelöst und nach dem Neutralisieren ist die Lösung wieder durch Enzym angreifbar. Diese Erscheinung, auf die bei den  $\alpha$ -Amylasen noch näher eingegangen wird, ist bei Amylose viel ausgesprochener als bei Amylopektin.

## 7. Die Wirkung von reiner $\alpha$ -Amylase auf Amylose

Wir haben die Einwirkung reiner Pankreasamylase (Schwein) sowie die reiner kristallisierter Malzamylase auf Amylose untersucht<sup>33, 34)</sup>. Wir prüften zwei Amylosepräparate, A<sub>1</sub> (Kartoffel) vom mittleren Molekulargewicht 11500 und A<sub>1</sub> (Mais) vom Molekulargewicht 40000. Reine Amylosen sind nur in sehr niedrigen Konzentrationen in Wasser klar löslich; sie müssen deshalb in verdünnter Lauge gelöst und in die schwach saure Enzymlösung eingegossen werden, damit sie in molekularer Zerteilung mit dem Enzym in Berührung kommen. Alle Versuche mit nicht übermäßig hohen Enzymkonzentrationen zeigten folgenden charakteristischen Reaktionsverlauf: bis zu einem bestimmten Spaltungsgrad verläuft die Reaktion rasch; dann sinkt die Spaltgeschwindigkeit stark ab und wird schließlich praktisch gleich Null. Der Abbaugrad, bei dem diese plötzliche Verlangsamung eintritt, ist aber nicht konstant. Die Verlangsamung der Reaktion tritt bei der höher molekularen Mais-Amylose A<sub>1</sub> früher ein als bei der von uns benutzten Kartoffel-Amylose A<sub>1</sub>. Ferner geht der rasche Abbau um so weiter, je mehr Enzym und je weniger Amylose von Anfang an zugegen sind<sup>33, 34)</sup>. Nachträglicher Enzymzusatz beschleunigt die einmal verlangsamte Reaktion nicht. Wenn dagegen alkalisch gemacht wird, wodurch das Enzym abgetötet und die Lösung, falls sie opalescent geworden ist, wieder aufgeheilt wird, und wenn sodann neutralisiert und frisches Enzym zugesetzt wird, dann beginnt die neue Reaktion mit der gleichen hohen Geschwindigkeit wie die erste (Bild 8). Dieses Verhalten läßt sich nicht durch die oben erwähnte Theorie *Myrbäcks* erklären; man muß es vielmehr dem „Altern“ der Amylose zuschreiben<sup>33)</sup>. Reine Amylose ist nämlich ziemlich schwer löslich in kaltem Wasser, kann aber leicht durch Alkali und darauffolgendes Ansäuern, sowie durch Erwärmen und Abkühlen in übersättigte Lösung gebracht werden. In dieser Lösung „altert“ oder „retrogradiert“ die Amylose langsam, d. h. sie bildet zuerst kleine, dann größere submikroskopische

<sup>30)</sup> K. H. Meyer, P. Bernfeld, P. Rathgeb u. P. Gürtler, ebenda 31, 1536 [1948].

<sup>31)</sup> R. A. Hopkins, E. G. Stapher u. D. E. Dolby, J. Inst. Brewing 46, 426 [1940].

<sup>32)</sup> K. H. Meyer, P. Bernfeld u. J. Press, Helv. Chim. Acta 23, 1465 [1940].

<sup>33)</sup> P. Bernfeld u. H. Studer-Pecha, ebenda 30, 1895 [1947].

<sup>34)</sup> K. H. Meyer u. W. F. Gonon, ebenda, im Erscheinen.

kristalline Aggregate, die vom Enzym nur sehr langsam angegriffen werden, darauf tritt Trübung und schließlich ein Niederschlag auf. Die Aggregate werden durch Alkali zerstört, was wir als „Verjüngung“ bezeichnen, und die verjüngte Lösung wird wieder leicht vom Enzym angegriffen. Falls viel Enzym von Anfang an zugegen ist, verläuft der Abbau so rasch, daß die Lösung keine Zeit hat, zu altern; der Unterschied im Verhalten gegen nieder- und höhermolekulare Amylose erklärt sich dadurch, daß letztere schwerer löslich ist und rascher kristallisiert (altert).

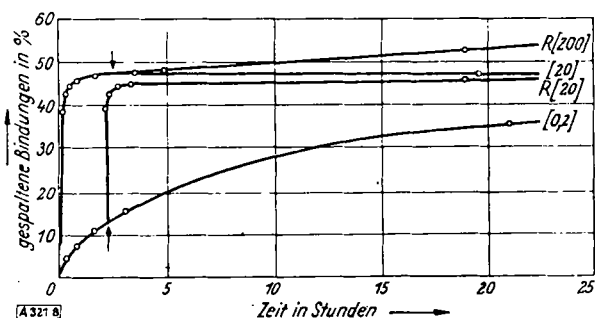


Bild 8

Einfluß der Enzymkonzentration [200] und der Verjüngung auf den Verlauf des Abbaus von Amylose durch Pankreas-Amylase.

† Verjüngung; R [20] nach Verjüngung hergestellte Enzymkonzentration

Falls die Lösung während des Abbaus altert, wird die Mischung der Spaltprodukte sehr inhomogen; denn neben stark abgebauten finden sich in ihr auch fast unversehrte Molekeln. Dagegen hat die oben erwähnte Verminderung der Affinität des Enzyms zum Substrat, wenn dieses allmählich niedermolekular wird, den entgegengesetzten Effekt: Die Mischung wird homogener, da zuerst alles Hochmolekulare verschwindet, bevor die Bruchstücke weiter abgebaut werden. Diese Homogenisierung tritt aber bei sehr großen Enzymkonzentrationen nicht ein; denn dann werden alle, auch die niedermolekularen Substrate, d. h. die Dextrine, mit Enzym abgesättigt. In diesem Falle fällt auch die auffallende Verlangsamung im Abbau fort, und man erhält sehr schnell ein Gemenge von Maltose und Triose; der Verlauf der Abbaukurve nähert sich dann dem einer monomolekularen Reaktion (Bild 8).

Sowohl Malz- wie Speichel- und Pankreas- $\alpha$ -Amylase bilden aus Amylose zunächst größere Bruchstücke; nach einer gewissen Zeit findet man Maltotriose, Maltotetraose und Maltose; Maltotetraose wird langsam in Maltose, Maltotriose in Maltose und Glucose gespalten. Endprodukte sind 13% Glucose und 87% Maltose. Es geht daraus hervor, daß Bindungen, an denen endständige Glucose-Reste beteiligt sind, sehr viel langsamer aufgespalten werden als die mittelständigen Bindungen und daß die von zwei endständigen Glucoseresten eingerahmten Bindungen der Maltose überhaupt nicht angegriffen werden. Dies liegt nun sicher nicht an der geringen Affinität des Enzyms zur Maltose, sondern daran, daß die Verbindung Amylase-Maltose nicht hydrolytisch zerfallen kann. Eine solche inaktive Verbindung ist tatsächlich nachgewiesen worden; sie bildet sich beim Zusatz von Maltose zum diastatischen Ansatz und entzieht dadurch einen Teil des Enzyms seiner Wirkung. Das Substrat kann auch in hoher Konzentration die Maltose aus dieser Verbindung nicht verdrängen; diese Erscheinung wird als „nicht competitive“ Hemmung bezeichnet.

Aus der Tatsache, daß das Substrat die Maltose aus dieser Verbindung mit dem Enzym nicht verdrängen kann, muß man schließen, daß Maltose an einer anderen Gruppe des Enzyms angelagert wird als das Substrat. Dies erklärt auch, daß Maltose überhaupt nicht gespalten wird; denn die hydrolytische Spaltung des Komplexes Enzym-Substrat muß wohl darauf zurückgeführt werden, daß in diesem Komplex eine glucosidische Bindung verzerrt und dadurch dem Angriff des Wassers zugänglich gemacht ist. Da Maltose aber anders als das spaltbare Substrat gebunden wird, fällt bei der Verbindung Maltose-Enzym die Voraussetzung für die hydrolytische Spaltung fort<sup>34)</sup>.

## 8. Die Wirkung reiner $\alpha$ -Amylasen auf Amylopektin

Auch hier wurde die Wirkung von Pankreas sowie Malz-Amylase auf Kartoffel-Amylopektin, dessen Molekulargewicht reduktometrisch zu 180000 ermittelt wurde, und andererseits auf Mais-Amylopektin vom Molekulargewicht ca. 40000 untersucht<sup>34)</sup>. Die Reaktion verläuft prinzipiell gleich wie bei Amylose. Auch hier beobachtet man einen durch „Altern“ und „Verjüngen“ beeinflussten Reaktionsverlauf. Die Geschwindigkeit des Abbaus ist aber geringer als bei Amylose, was wohl darauf beruht, daß Amylopektin in Form von Teilchen in Lösung geht, die aus vielen miteinander verfilzten Molekeln bestehen und daher dem Angriff des Enzyms weniger zugänglich sind. Ferner sinkt die Affinität des Enzyms zum Substrat bei fortschreitendem Abbau desselben stärker ab als bei Amylose, und zwar besonders stark bei Malz- $\alpha$ -Amylase. Wie schon Myrbäck<sup>34a)</sup> und Hopkins<sup>34b)</sup> erkannten, ist ihre Affinität zu den verzweigten Oligosacchariden sehr gering. Anders als bei Amylose wird hier die auffallende Verlangsamung der Abbaureaktion weniger durch das Altern als durch die Minderung der Affinität verursacht. Bei sehr großen Enzymkonzentrationen geht aber auch hier die Reaktion rasch zu Ende<sup>34)</sup>.

Als Spaltprodukte der ersten, schnellen Etappe findet man kaum Glucose, viel Maltose, ca. 20% andere Oligosaccharide, darunter Isomaltose und unverzweigte und verzweigte Tri- und Tetrasaccharide. Tri- und Tetrasaccharide werden sehr langsam weiter gespalten; als Endprodukte findet man ca. 19% Glucose, 72% Maltose und 8–9% Isomaltose; alle Zweigstellen finden sich schließlich in der Isomaltose wieder. Weder im Speichel, noch im Pankreas findet sich Maltase; einmal gebildete Maltose wird erst im Darm gespalten.

Auch hier wirkt Maltose als Hemmstoff, indem ein Teil des Enzyms gebunden wird. In Gegenwart von Hefe geht der Abbau schneller vonstatten, da Maltose und von gewissen Hefarten auch Isomaltose vergärt werden und dadurch die von ihnen ausgeübte Hemmung wegfällt.

Werden Stärkelösungen, d. h. Stärkekleister, die durch Autoklavieren oder durch Kochen unter starkem Rühren in wirkliche Lösung gebracht sind, dem Angriff von Malz ausgesetzt, so verlaufen die oben besprochenen Reaktionen,  $\beta$ - und  $\alpha$ -amylatischer Abbau, nebeneinander. Dabei wird der  $\beta$ -amylatische Angriff sich stärker auswirken können und mehr Maltose entstehen, als dem bloßen Nebeneinander entsprechen würde; denn wo immer durch  $\alpha$ -Amylase eine nichtaldehydische Endgruppe freigelegt wird, greift die  $\beta$ -Amylase an und bildet Maltose.

## 9. Der Abbau von Stärke und Stärkekleister

Um die beim Abbau von unversehrten Stärkekörnern sowie von Kleister auftretenden Erscheinungen zu verstehen, wird man sich zunächst über den molekularen Feinbau des Korns im nativen und gequollenen Zustand informieren müssen, über den man jetzt sehr genaue und begründete Vorstellungen hat.

Durch die polarisationsoptischen Untersuchungen von Naegeli und A. Meyer<sup>35)</sup> sowie die Röntgeninterferenzsaufnahmen von Katz<sup>36)</sup> war nachgewiesen worden, daß das Stärkekorn großenteils aus radiär angeordneten nadelförmigen, sehr kleinen Kristalliten besteht, also den Bau eines „Sphäriten“ hat. Die elastische Deformierbarkeit des Korns und die Quellungserscheinungen waren aber damit nicht zu erklären. Dazu mußte eine Theorie herangezogen werden, die sich für alle Kettenpolymeren als gültig erwiesen hat und in aller Klarheit wohl zuerst von Haller<sup>37)</sup> ausgesprochen worden ist. Sie besagt, daß die Teile einer hochpolymeren Fadenmolekel thermodynamisch sich so benehmen können, als ob sie voneinander unabhängig wären. Die Wärmebewegungen der „Segmente“ an einem Ende der Molekel sind z. B. unabhängig von denen am anderen Ende der Molekel. Die unregelmäßigen thermischen Bewegungen der Segmente führen unter anderem dazu, daß eine durch äußeren Zwang gestreckte Fadenmolekel die Tendenz hat, sich zusammenzukurven und zu

<sup>34a)</sup> Arkiv kem. Mineral. Geol. 20 A, Nr. 6 [1945]; Svensk Kem. Tidsk. 56, 142 [1944]; Arkiv Kem. 1, Nr. 1 [1949].

<sup>34b)</sup> Adv. in Enzymology 6, 383 [1946].

<sup>35)</sup> Untersuchungen über die Stärkekörner, Jena, 1895.

<sup>36)</sup> Z. physik. Chem. (A) 150, 100 [1930].

<sup>37)</sup> Kolloid-Z. 56, 257 [1931].

verkürzen (Theorie der Kautschukelastizität von K. H. Meyer, v. Susich und Valkö<sup>38</sup>). Auch beim Kristallisieren können sich die Segmente wie unabhängige Molekeln benehmen: Segmente einer Molekel können sich mit Segmenten benachbarter Molekeln zum Raumgitter zusammenlegen, während andere Segmente noch gelöst, d. h. von Lösungsmittel umgeben sind. Auf diese Weise erklärt sich die Bildung zusammenhängender Gele beim Abkühlen der Lösungen von Gelatine, Pektin usw. Die Molekelfäden werden durch kristalline Partien miteinander zu einem elastischen, mit Flüssigkeit gefüllten dreidimensionalen Netz verknüpft. Umgekehrt hängen die Kristallite, von Gerngross<sup>39</sup>, der dieses Bild zuerst gezeichnet hat, als „Fransenmicelle“ bezeichnet, miteinander durch Molekelfäden zusammen. Nach dem gleichen Prinzip ist auch das Stärkekorn aufgebaut: Naegeli's kristalline Micellen sind Fransenmicellen, die durch Molekelfäden miteinander verknüpft sind<sup>40</sup>). Die Zweigstellen der Amylopektinmolekeln, die nicht in das regelmäßige Raumgitter der Kristallite hineinpassen, werden sich dabei in den freien „Fadenteilen“ des Korns befinden (Bild 9).

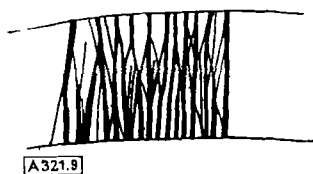


Bild 9  
Schema der Anordnung der kristallinen Micelle (dick gezeichnet) und der sie verbindenden Hauptvalenzketten in einer Schicht des Stärkekorns

Wenn nun Amylase auf Stärkekörner einwirkt, so wird sie zunächst die nicht kristallinen Partien angreifen können. Es entstehen die sog. Speichelskelette, die noch Sphärite sind, aber leicht in einzelne Kristallnadelchen zerfallen, da die verbindenden Molekelfäden zerschnitten sind. Anders wie in der wässrigen Lösung wird Amylose hier langsamer angegriffen als Amylopek-

<sup>38</sup>) Ebenda 59, 208 [1932].

<sup>39</sup>) Biochem. Z. 228, 409 [1930].

<sup>40</sup>) K. H. Meyer u. P. Bernfeld, Helv. Chim. Acta 24, 389 [1941].

tin, da erstere sich fast ausschließlich in kristallisierter Form befindet.

Werden die Stärkekörner in Wasser erwärmt, so schmelzen oder lösen sich die kristallinen Knüpfstellen teilweise auf. Die konzentrischen Schichten des Stärkekorns werden weitmaschige Netze (vgl. Bild 10), durch die Wasser ins Innere strömt. Die

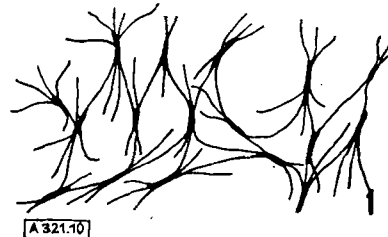


Bild 10  
Schematische Darstellung des losen Netzwerks der gequollenen Amylopektinschicht. Die kristallinen Knüpfstellen dick gezeichnet

Körner werden zu riesigen, wassergefüllten Blasen, die beim Fließen des Kleisters einen großen Widerstand bilden und die hohe Viscosität des Kleisters hervorrufen<sup>41</sup>). Wenn die Netzhülle dieser Blasen durch Amylase zerschnitten wird, so sinkt die Viscosität plötzlich stark ab. Schon bei sehr geringer Hydrolyse kann dies eintreten, was zu der Annahme geführt hat, daß ein besonderes verflüssigendes Enzym im Speichel enthalten ist. Doch hat sich diese Annahme als falsch erwiesen<sup>27, 42</sup>).

In den üblichen Kleistern finden sich Korntrümmer neben gelösten Stärkebestandteilen: wie die einzelnen Reaktionen in ihnen verlaufen, hängt u. a. von dem Grad des Aufschlusses der Kleister ab.

Somit läßt es sich nicht von vornherein sagen, wie der Stärkeabbau in den technischen Ansätzen verläuft, z. B. beim Mälzen oder in der Spritfabrikation. Dies müßte für jeden Fall mit Hilfe geeigneter Methoden, z. B. den hier benutzten, festgestellt werden.

Eingegangen am 18. Oktober 1950 [A 321]

<sup>41</sup>) K. H. Meyer u. M. Fuld, ebenda 24, 375 [1941].

<sup>42</sup>) K. H. Meyer, F. Duckert u. Ed. H. Fischer, ebenda 33, 207 [1950].

## Mikrochemie in den Vereinigten Staaten

Von Prof. Dr. A. A. BENEDETTI-PICHLER, Queens College, Flushing, N. Y.

Es sollen hier die bemerkenswertesten Züge mikrochemischer Arbeit in den USA gezeigt werden. Da es unmöglich ist, auf Einzelheiten einzugehen, sind die Literaturhinweise so gewählt, daß sie zur Erschließung der US.-Fachliteratur benutzt werden können. Die Kenntnis der deutschen Entwicklungen hingegen wird, als durch Spezialzeitschriften und Veröffentlichungen dieser Zeitschrift bekannt, vorausgesetzt.

### Einleitung

Jeder Wissenszweig wird sich in allen westlichen Ländern zwangsläufig gleichartig entwickeln. Örtliche Unterschiede mögen durch spezielle Bedürfnisse, qualitative oder quantitative Verschiedenheiten in den verfügbaren Mitteln, oder durch eine wirkungsvolle Persönlichkeit hervorgerufen werden. Alle diese Umstände scheinen in den Vereinigten Staaten zusammengewirkt zu haben, um der Entwicklung mikrochemischer Arbeit nach ursprünglicher Verzögerung einen besonderen Ansporn zu geben.

Während des ersten Viertels des Jahrhunderts stand die Entwicklung unter dem Einfluß von Émile Monnin Chamot, der Heinrich Behrens mikroanalytische Methoden in Delft studierte, mische Mikroskopie aus. Zusammen mit C. W. Mason<sup>1)</sup> lehrte er chemische Mikroskopie als Fachgebiet an der Cornell hatte, dann aber seinen eigenen Weg ging. Er bildete die chemische University in Ithaca, N. Y., und manche andere Schule ist dem Beispiel gefolgt. Diese Spezialausbildung im Mikroskopieren erweist sich für die Bearbeitung mancher industrieller Probleme sehr wertvoll.

<sup>1)</sup> E. M. Chamot u. C. W. Mason: Handbook of Chemical Microscopy, Volume I, Principles and Use of Microscopes and Accessories; Physical Methods for the Study of Chemical Problems. John Wiley & Sons, New York, N. Y., 2. Aufl., 1938. — Der zweite Teil beschäftigt sich hauptsächlich mit dem mikroskopischen Nachweis anorganischer Ionen und ist mit Behrens-Kley: Mikrochemische Analyse, I. Teil, zu vergleichen.

So sei eine geringe Menge eines Sedimentes die Ursache einer Betriebsstörung. Durch mikroskopische Untersuchung kann man rasch und mit verhältnismäßig geringer Mühe Metallteilchen, Haare, Fasern, Pflanzenteile, oder Teile von Insektenkörpern erkennen und damit auch die Herkunft des Sedimentes aufklären. Dazu braucht man eine Spezialausbildung, ebenso wie besondere Fähigkeit, gleich dem bildenden Künstler: Beobachtungsgabe und Gedächtnis für Form und Farbe. Der Spezialist wird gewohnheitsmäßig zum Studium der Feinstruktur schreiten, das oft den einzigen Weg zur einfachen Lösung einer anscheinend unverständlichen Erscheinung bietet. Erfahrung in solchen Arbeiten erleichtert auch die zuweilen notwendige mechanische Abtrennung mikroskopischer Objekte zur nachfolgenden mikrochemischen Analyse.

Das Polarisationsmikroskop wird heute noch an erster Stelle zur Untersuchung von Gesteins- und Bodenproben<sup>2)</sup>, von Mineralstaub und von in Gemälden verwendeten Pigmenten<sup>3)</sup>

<sup>2)</sup> W. H. Fry, Petrographic Methods for Soil Laboratories, U.S. Department of Agriculture, Technical Bulletin No. 344, 1933. M. N. Short, Microscopic Determination of the Ore Minerals, U.S. Geological Survey, Bulletin 825, benutzt einfache chemische Nachweise unter dem Mikroskop. Erhältlich vom Superintendent of Documents, Washington, D. C., gegen von 0.15 bzw. 0.60 \$.

<sup>3)</sup> R. J. Gettens, Technical Studies 7, 200–243 u. 8, 12–60 [1939]. Eine ausführliche Beschreibung der Pigmente.