

KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN DER DURCH DIE CYCLODEXTRIN-GLYCOSYLTRANSFERASE KATALYSIERTEN (1→4)- α -D-GLUCOPYRANOSYLTRANSFERREAKTIONEN, INSBESONDERE DER ZYKLISIERUNGSREAKTION, MIT AMYLOSEN, AMYLOPEKTIN UND GESAMTSTÄRKE ALS SUBSTRATE*

HANS BENDER

Chemisches Laboratorium der Universität, Albertstr. 21, D-7800 Freiburg i.Br. (Bundesrepublik Deutschland)

(Eingegangen am 8. November 1978; angenommen in revidierter Form am 4. April 1979)

ABSTRACT

The time course of the (1→4)- α -D-glucopyranosyltransfer reactions catalyzed by the cyclodextrin glycosyltransferase {(1→4)- α -D-glucan: [(1→4)- α -D-glucopyranosyl]transferase (cyclizing), EC 2.4.1.19, CGT} from *Klebsiella pneumoniae* was studied with several commercial amyloses, potato starch, and amylopectin, respectively. Amyloses were poor substrates for the cyclization reaction. In the initial phase of the transfer reactions, the CGT catalyzed a rapid shortening of the amylose chains. The rate of this shortening reaction was significantly accelerated by addition of maltooligosaccharides. Maximum rate of cyclohexaamylose formation was reached with amylose chains sufficiently short ($< \text{Glc}_{100}$) for the cyclization reaction. Cyclohexaamylose was formed with maximum rate from amyloses containing amylopectin impurities in the initial phase of the transfer reactions, suggesting that the non-reducing ends of the outer amylopectin chains serve as acceptors for the disproportionation of the amylose. Accordingly, water-soluble, high-molecular-weight products containing higher percentages of lengthened outer-chains were obtained from potato starch or amylopectin. In the course of the transfer reactions, only traces of smaller maltooligosaccharides were detected chromatographically.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Zeitabhängigkeit der durch die Cyclodextrin-Glycosyltransferase {(1→4)- α -D-glucan: [(1→4)- α -D-glucopyranosyl]transferase (cyclizing), EC 2.4.1.19, CGT} von *Klebsiella pneumoniae* M 5 a1 katalysierten Transferreaktionen wurde mit verschiedenen käuflichen Amylosen, mit Kartoffelstärke und mit Amylopektin untersucht. Amylosen waren schlechte Substrate für die Zyklisierungsreaktion. In der

*5. Mitteilung über Cyclodextrin-Glycosyltransferase von *Klebsiella pneumoniae* M 5 a1; 4. Mitteilung, siehe Zit. 1.

initialen Phase der Transferreaktionen katalysierte die CGT eine rapide Verkürzung der Amyloseketten. Die Geschwindigkeit der Kettenverkürzung wurde durch den Zusatz von Maltooligosacchariden signifikant erhöht. Cyclohexaamylose wurde mit maximaler Geschwindigkeit gebildet, nachdem die Amyloseketten auf eine für die Zyklisierungsreaktion erforderliche Länge ($< \text{Glc}_{100}$) verkürzt waren. Mit Amylosen, die noch Verunreinigungen an Amylopektin enthielten, wurde Cyclohexaamylose in der initialen Phase der Transferreaktion mit maximaler Geschwindigkeit gebildet. Offensichtlich dienten die nicht reduzierenden Enden der äusseren Ketten des Amylopektins als Akzeptoren für die Disproportionierung der Amylose. Dementsprechend wurden mit Kartoffelstärke oder Amylopektin hochmolekulare, wasserlösliche Produkte erhalten, die einen höheren Prozentsatz an verlängerten äusseren Ketten enthielten. Im Verlauf der Transferreaktionen konnten chromatographisch nur Spuren an kürzeren Maltooligosacchariden nachgewiesen werden.

EINLEITUNG

In einer vorhergehenden Arbeit¹ haben wir über die durch die Cyclodextrin-Glycosyltransferase $\{(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-glucan:} [(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranosyl}] \text{transferase (cyclizing), EC 2.4.1.19, CGT}\}$ von *Klebsiella pneumoniae* M5 a1 mit $(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glucopyranosylketten } \bar{P}_n$ 16* katalysierten Transferreaktionen berichtet. Wir konnten zeigen, daß das Enzym parallel zur Zyklisierungsreaktion eine Disproportionierung des Substrates katalysiert, die zu kürzeren Maltooligosacchariden einerseits und zu $(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glucopyranosylketten}$ andererseits führt, deren Längen signifikant über denen des eingesetzten Substrates liegen. Aufgrund der erhaltenen Befunde konnte nunmehr daran gegangen werden, den Verlauf der Transferreaktionen mit den Substraten Amylose, Amylopektin bzw. nativer Stärke eingehender zu studieren und damit die vor allem mit der CGT von *Bacillus macerans* durchgeführten älteren Arbeiten erneut aufzugreifen. Bei diesen Untersuchungen ging es hauptsächlich um die mit den verschiedenen Stärken bzw. Stärkeprodukten zu erhaltenden Ausbeuten an zyklischen Transferprodukten. Es zeigte sich, daß die Menge an Cyclodextrinen von den jeweils verwendeten Substraten abhängen². Die grössten Ausbeuten wurden erwartungsgemäss mit Amylosen erhalten (je nach Substratkonzentration³⁻⁵ 70–90%). Mit langkettigen Amylosen entsprachen die Ausbeuten jedoch nicht der Theorie, was u.a. damit erklärt wurde, daß die langkettigen Substrate im Verlauf der Inkubation durch Retrogradierung unlöslich werden². Für die verzweigten Amylopektine und Glykogene wurden Ausbeuten von 40–50% an zyklischen Transferprodukten angegeben²⁻⁴.

Bei entsprechend langer Inkubation von Stärkesubstraten nahm der Gehalt an niedermolekularen linearen Transferprodukten zu², wobei jedoch nicht auszuschliessen war, daß die verwendete CGT (*Bacillus macerans*) noch Verunreinigungen an α -Amylase enthielt⁶. Wie Untersuchungen mit der CGT eines Stammes von

* \bar{P}_n , durchschnittlicher Polymerisationsgrad.

Bacillus megaterium zeigten, kann die Zunahme an Maltooligosacchariden durch Zugabe von Glucose zu einem Transferansatz mit löslicher Stärke als Substrat stark erhöht werden⁷. Da die Ausbeuten an zyklischen Transferprodukten durch diesen Zusatz nicht wesentlich beeinflusst werden, wurde auf einen Transfer von (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten aus der Stärke sowohl direkt auf den "Akzeptor" D-Glucose wie auch über Cyclodextrine geschlossen.

Eine charakteristische Eigenschaft der CGTs ist es, Stärke- bzw. Amylopektin-Gele rapide zu verflüssigen⁸⁻¹⁰. Diese Tatsache wurde mit einer hydrolytischen Aktivität der Enzyme erklärt^{2,10,11}. French¹² diskutiert eine mögliche hydrolytische Eigenschaft der CGTs vorsichtig: "...Alternatively a glucanose chain of any length can react with a suitable acceptor. If the acceptor concentration is too low for reaction, the glucanose-enzyme probably undergoes slow hydrolysis with the formation of a new reducing group...".

Im Gegensatz zu dem in der vorhergehenden Arbeit¹ verwendeten können die hochmolekularen Substrate nur in wesentlich geringeren molaren Konzentrationen eingesetzt werden. Da die CGT vom nicht reduzierenden Ende einer (1→4)- α -D-Glucopyranosylkette her Cyclohexaamylose abspaltet², sollten die Bildungsgeschwindigkeiten für das Cyclodextrin entsprechend geringer sein, wenn die molare katalytische Aktivität des Enzyms mit den langkettigen Amylosen nicht signifikant grösser ist. Mit Amylopektinen dagegen sollte die initiale Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamylose grösser sein, da diese verzweigten α -D-Glucose eine — verglichen zum Molekulargewicht und damit zu reduzierenden Kettenenden — grosse Anzahl an nicht reduzierenden Enden besitzen.

Vor allem die Verwendung von Amylosen als Substrate bringt experimentelle Schwierigkeiten. Die in dehydratisierter Form käuflichen Präparate sind aufgrund der eingetretenen Retrogradierung wasserunlöslich. Sie können zwar in Dimethylsulfoxid gelöst werden¹³⁻¹⁵, retrogradieren jedoch bei Wasserzugabe mehr oder weniger schnell, wobei die Geschwindigkeit der Retrogradierung von verschiedenen Faktoren, z.B. Kettenlängen, Konzentration, pH-Wert oder der Anwesenheit bestimmter Ionen abhängt (zu Übersicht siehe ¹³). Exakte Versuchsergebnisse werden dann in Frage gestellt, wenn die Retrogradierung in Verlauf der Inkubation der Transferansätze eintritt. Die meisten Amylosen enthalten noch einen gewissen Anteil an α -D-(1→6)-glucosidischen Bindungen, sie sind demnach nicht vollständig "linear" (zur Übersicht siehe ¹⁵). Unbekannt ist bei käuflichen Amylosen auch der Reinheitsgrad, z.B. die Mengen an verunreinigendem Amylopektin bzw. an Nicht-Stärke-Komponenten¹³. Bewusst sollten für die geplanten Versuche käufliche Präparate eingesetzt werden, um möglicherweise eine Verwendung der CGT zur Reinheitsbestimmung aufzeigen zu können.

EXPERIMENTELLER TEIL

Material. — CGT wurde aus dem Kulturfiltrat von *Klebsiella pneumoniae* M 5 a1 nach Vorschrift isoliert und bis zur elektrophoretischen Einheitlichkeit ge-

reinigt^{9,16}. Isoamylase (Amylopectin:6-glucanohydrolase, EC 3.2.1.9) wurde aus dem Kulturfiltrat von *Pseudomonas amyloclavata* ATCC 21 262 nach dessen Konzentrierung durch Ultrafiltration (Diaflo Hollow Fiber-Patrone H 10 P 10 von Amicon, Witten, BRD) nach Vorschrift gereinigt¹⁷. Das Bakterium wurde in dem angegebenen Medium¹⁸ mit 1,2% Mor Sweet 01415 (Maltose-Sirup der Maizena GmbH, Hamburg, BRD) als Kohlenstoffquelle kultiviert (Fermenterbedingungen: 200 L-Fermenter, Rührgeschwindigkeit 150 r.p.m., Belüftung 5000 L Luft/h, pH_{konst.} 6,5, Inkubationstemperatur 34°, Inkubationsdauer 30 h. β -Amylase [(1 \rightarrow 4)- α -D-glucan:maltohydrolase, EC 3.2.1.2] aus Bataten (500 U/mg, 3 \times krist., reinst) war von Serva (Heidelberg, BRD), Amyloglucosidase [(1 \rightarrow 4 bzw. 6)- α -D-glucan:glucohydrolase, EC 3.2.1.3] von Boehringer (Mannheim, BRD).

Als Substrate für die Transferansätze dienten: Amylose 95% rein aus Kartoffelstärke, Mol.Gew. 150 000 (Katalog-Nr. 12470, Serva, Heidelberg, BRD): Eigene Bestimmungen ergaben bei einem \bar{P}_n -Wert von $840 \pm 5\%$ ein Mol. Gew. von 136 000 $\pm 5\%$ (AmS). Amylose practical grade (Katalog-Nr. 0488, Baker Chemical Co., Groß-Gerau, BRD): Eigene Bestimmungen ergaben bei einem \bar{P}_n -Wert von 790 $\pm 5\%$ ein Mol.Gew. von 128 000 $\pm 5\%$ (AmB). Amylose, geeignet für biochemische und bakteriologische Arbeiten, aus Maisstärke (Katalog-Nr. 2-5520, Roth KG, Karlsruhe, BRD): Eigene Bestimmungen ergaben bei einem \bar{P}_n -Wert von 580 $\pm 5\%$ ein Mol.Gew. von 94 000 $\pm 5\%$ (AmR). Amylose aus Kartoffelstärke, Praktikumspräparat, gereinigt nach Zit. 14. Das Präparat enthält noch $\sim 15\%$ an Amylopektin. Die Bestimmung ergab bei einem \bar{P}_n -Wert von 1500 $\pm 5\%$ ein Mol.Gew. von 250 000 $\pm 5\%$ (AmK). Kartoffelstärke von Henkel & Cie (Düsseldorf, BRD). Amylopectin powder (Katalog-Nr. 0400 h, Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook Bucks, UK).

Die Maltooligosaccharid-Mischung wurde aus Transferansätzen der CGT mit dem Substrat Cyclohexaamylose und dem Akzeptor Maltose nach gegebener Vorschrift isoliert und gereinigt¹. Alle anderen verwendeten Substanzen waren in handelsüblicher, falls erforderlich, in reiner Form.

Analytische Methoden. — Kohlenhydrate wurden mit Anthron^{19,20} und reduzierende Aldehydgruppen mit dem Nelson-Reagens²¹ bestimmt. Die Bestimmung der \bar{P}_n -Werte der (1 \rightarrow 4)- α -D-Glucopyranosylketten (Amylosen) erfolgte nach Gunja-Smith *et al.*²²: Gesamtkohlenhydrate (als Glucose)/reduzierende Glucoseenden. Die Bestimmung der Polymerisationsgrade langkettiger Amylosen nach dieser Methode mag mit einem grösseren Fehler behaftet sein. Sie erwies sich jedoch für die im Verlauf dieser Arbeit durchzuführenden Vergleichsmessungen als ausreichend. D-Glucose wurde enzymatisch bestimmt²³.

Die Absorptionsspektren von Iodkomplexen der Substrate bzw. der Restsubstrate wurden mit einem Shimadzu Einstrahl-Spectrophotometer (Shimadzu Seisakusho Ltd. Kyoto, Japan) UV 100-02 gemessen. Zur Herstellung der Iodkomplexe wurde 10 mL von 0,012% Lösungen der α -D-Glucose mit 0,15 mL einer 20mM Lösung von I₂ in 20mM KI versetzt, die Messungen erfolgten bei 25°. Bei Amylopektin und dessen Restsubstrate wurden Iodkomplexe gemessen, die mit 0,06 mL der Iod-Iodkalium-Lösung gebildet wurden.

Die Papierchromatographie der Maltooligosaccharide wurde in Wasser-Äthanol-Nitromethan (5:8:7, v/v) dreimal absteigend auf Whatman Nr. 1 bei 25° vorgenommen. Die getrockneten Chromatogramme wurden mit der Eintauchmethode (AgNO_3 in Aceton, methanolische NaOH) entwickelt.

Durchführung und Aufarbeitung der Transferansätze. — Alle Transferansätze wurden in 10mM Tris · HCl-Puffer, pH 7,2 (5mM an CaCl_2), mit einer CGT-Konzentration von 14 mg Protein/L und bei einer Inkubationstemperatur von 30° durchgeführt. Jeweils 100 mL der Ansätze wurden für einen Zeitwert eingesetzt. Die wasserunlöslichen Amylosen wurden 20%ig in Dimethylsulfoxid durch vorsichtiges Erhitzen gelöst, die erhaltenen klaren, hochviskosen Lösungen wurden mit heissem Puffer auf die gewünschte Endkonzentration des Substrates verdünnt. Sofort nach Abkühlung auf 30° wurden die Transferansätze durch Zugabe des Enzyms gestartet. Vergleichsuntersuchungen zeigten, daß Dimethylsulfoxid in der vorgegebenen Konzentration die CGT nicht hemmt. Die nach Abkühlung leicht trüben Amylose-dispersionen erwiesen sich in Kontrollen ohne Enzym bei 30° über einen Zeitraum von ~1 h als stabil. Die wasserlöslichen Substrate Kartoffelstärke und Amylopektin wurden direkt in Puffer durch vorsichtiges Erhitzen gelöst.

Die enzymatische Reaktion wurde nach Erreichen der gewünschten Inkubationszeiten durch schnelle Zugabe von Methanol (1,2 Vol.) gestoppt. Das für die Aufarbeitung der Transferansätze ausgearbeitete Schema¹ musste für die Dimethylsulfoxidhaltigen Lösungen weiter modifiziert werden, da es sich zeigte, daß Cyclohexaamylose und die Maltooligosaccharide in diesen Ansätzen nicht quantitativ fraktioniert werden konnten:

(a) Das im Verlauf der Inkubation retrogradierte und das mit 1,2 Vol. Methanol präzipitierbare Material wurde nach 24 h Stehen der Fällungen (0°) durch Zentrifugation abgetrennt, dreimal nach Erhitzen in je 60 mL dest. Wasser mit Methanol (1,2 Vol.) repräzipitiert und anschliessend lyophilisiert.

(b) Die vereinigten Überstände aus (a) wurden nach Einengung im Rotationsverdampfer lyophilisiert. Das wasserfreie Lyophilisat wurde durch zweimaliges Waschen mit reinem Aceton von Dimethylsulfoxid befreit und nach Lösen in je 30 mL dest. Wasser wie beschrieben weiter fraktioniert¹.

Die Bestimmung der Ausbeuten an Transferprodukten und die Prüfung der Zuverlässigkeit der Fraktionierung wurden in der angegebenen Weise vorgenommen¹. Vor dem Abbau der Proben von möglicherweise verzweigten Restsubstraten zur enzymatischen D-Glucosebestimmung durch Amyloglucosidase wurde mit Isoamylase vorinkubiert.

Zur Bestimmung reduzierender Aldehydgruppen bzw. zur colorimetrischen Bestimmung des Gesamtkohlenhydrats mit Anthron wurden die wasserunlöslichen Restsubstrate durch Erhitzen 4%ig in Dimethylsulfoxid gelöst und anschliessend mit heissem dest. Wasser entsprechend verdünnt.

Aus solchen, zunächst klaren Lösungen wurde auch eine Fraktionierung der Restsubstrate vorgenommen: Das bei längerem Stehen der Lösungen retrogradierende Material wurde nach 5 min Erhitzen auf 98° durch Zentrifugation bei 50° abgetrennt.

In gleicher Weise wurde das sich nach 24 h Stehen der 50°-Überstände bei 4° bildende Präzipitat abzentrifugiert. Gesamtkohlenhydrat und reduzierende Aldehydgruppen wurden in allen erhaltenen Fraktionen in der beschriebenen Weise bestimmt.

Zur Spaltung von α -D-(1 \rightarrow 6)-glucosidischen Bindungen (Verzweigungen) wurden die Substrate bzw. Restsubstrate mit Isoamylase in 60mm Acetatpuffer, pH 3,6, inkubiert. Pro 500 mg Substrat wurden 20 Isoamylase-Einheiten eingesetzt. Die Entzweigung war, wie die zur Kontrolle durchgeführte β -Amylolyse von Proben der Ansätze ergab, nach 20 h bei 30° vollständig.

ERGEBNISSE

Zeitlicher Verlauf der (1 \rightarrow 4)- α -D-Glucopyranosyltransfer-Reaktionen mit Amylose Serva (AmS) und Amylose Baker (AmB). — Eine frisch zubereitete, leicht trübe "Lösung" von AmS in Puffer (Gehalt an Dimethylsulfoxid 16%) wird nach Zugabe von CGT trüber und zähflüssig. Diese im Verlauf der Inkubation fortschreitende Verdickung der Transferansätze macht es unmöglich, mit höheren Substratkonzentrationen als 2,5% zu arbeiten. Die Zyklisierung zu Cyclohexaamylose zeigt bei dieser Anfangskonzentration des Substrates ($\sim 0,18$ mm) eine relativ lange Anlaufphase, maximale Geschwindigkeit der Zyklisierungsreaktion wird erst nach 8,5 min Inkubation erreicht (AmS₁, Abb. 1, Kurve 1); v_{\max} beträgt $0,6 \text{ kat} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Protein}$. Für v_i in der ersten Minute der Inkubation ist dagegen ein Wert von nur $0,036 \text{ kat} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Protein}$ zu bestimmen. Nach 5 h Inkubation ist mit 13,4mm die maximale Menge an Cyclohexaamylose erreicht.

Vollkommen anders verläuft die zeitabhängige Zunahme an Cyclohexaamylose, wenn dem Transferansatz bei der Anfangskonzentration des Substrates AmS von $\sim 0,16$ mm Maltooligosaccharide (\bar{P}_n 8,4) in einer Konzentration von 2,8mm zugefügt werden (AmS₂, Abb. 1, Kurve 2). Nach nur kurzer Anlaufphase ist die maximale Bildungsgeschwindigkeit des Cyclodextrins erreicht (v_{\max} $1,8 \text{ kat} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Protein}$).

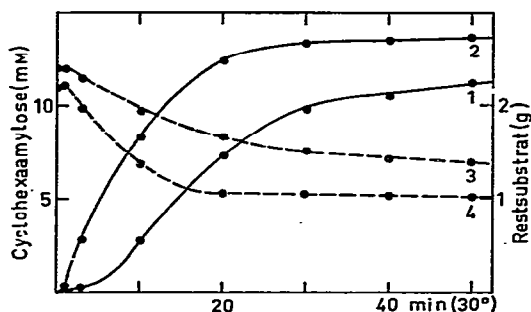


Abb. 1. Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamylose und zeitabhängiger Substratumsatz mit Amylose Serva (AmS₁) und Amylose Serva + Maltooligosaccharide (AmS₂) im Verlauf 60 min Inkubation (30°). Anfangskonzentration des Substrates AmS₁ 2,5%, AmS₂ 2,2% + 2,8mm Maltooligosaccharide \bar{P}_n 8,4, 14 mg CGT/L. Für die Aufarbeitung siehe Experimenteller Teil bzw. Zit. 1. Kurven 1 und 2: Verlauf der Zunahme an Cyclohexaamylose bei AmS₁ bzw. AmS₂. Kurven 3 und 4: Substratumsatz mit AmS₁ bzw. AmS₂.

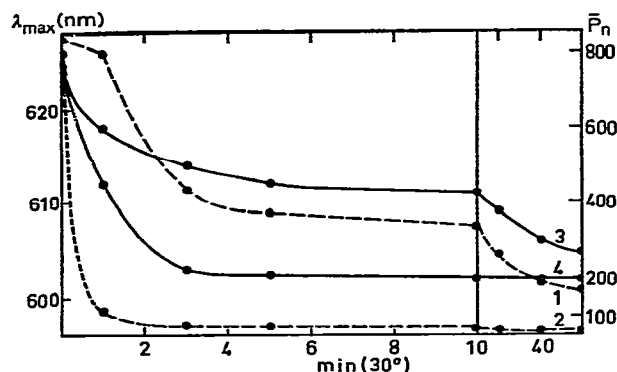


Abb. 2. Zeitabhängige Abnahme der \bar{P}_n -Werte der Restsubstrate und Änderung der Absorptionsmaxima ihrer Iodkomplexe im Verlauf der Inkubation mit AmS₁ bzw. AmS₂. Für die Aufarbeitung der Restsubstrate, die Bestimmung ihrer \bar{P}_n -Werte und die Herstellung der Iodkomplexe siehe Experimenteller Teil. Kurven 1 und 2: \bar{P}_n -Werte der Restsubstrate bei AmS₁ und AmS₂. Kurven 3 und 4: Absorptionsmaxima der Restsubstrat-Iodkomplexe bei AmS₁ und AmS₂.

Maximal ist nach 60 min Inkubation eine Konzentration an Cyclohexaamylose von 13,6mM zu bestimmen. Entsprechend der grösseren Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamylose nimmt die Menge an offensichtlich nicht umgesetztem Substrat bei AmS₂ schneller ab als bei AmS₁ (Abb. 1, Kurven 3 und 4). Wie die Analyse ergibt, sinken die \bar{P}_n -Werte der aus den Zeitproben zurückgewonnenen Restsubstrate im Verlauf der Inkubation, vor allem in der initialen Phase der Transferreaktion, wobei die Geschwindigkeit der Kettenverkürzung bei AmS₂ signifikant grösser ist (Abb. 2, Kurven 1 und 2). Die zeitabhängige Abnahme der Kettenlängen bewirkt eine Verschiebung der Absorptionsmaxima der mit den Restsubstraten erhaltenen Iodkomplexe in den kürzerwelligen Bereich des Spektrums (Abb. 2, Kurven 3 und 4)*.

Die Geschwindigkeit der Kettenverkürzung ist sowohl bei AmS₁ wie auch bei AmS₂ weit grösser, als es einer Abnahme der \bar{P}_n -Werte ausschliesslich durch Zyklisierungsreaktionen entsprechen würde. Trotz der Verschiebung der Absorptionsmaxima der Iodkomplexe könnte eine Abnahme der durchschnittlichen Kettenlängen zum Teil wenigstens durch eine Mischung von nicht umgesetztem Substrat und wesentlich kürzeren (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten vorgetäuscht werden. Eine Fraktionierung des aus den Zeitproben zurückgewonnenen Restsubstrats zeigt, daß dies nicht der Fall ist: Bei AmS₁ nehmen die Gesamtmengen der bei 50° unlöslichen Amylofefraktion sowie deren \bar{P}_n -Werte im Verlauf der Inkubation stetig ab. Das bei 4° unlösliche Material nimmt im Verlauf 20 min Inkubation zu, seine Menge bleibt aber dann annähernd konstant, die \bar{P}_1 -Werte sinken von 120 auf 90 und verringern sich erst in der späteren Phase der Transferreaktionen (Abb. 3, Kurven 1 und 2).

*Die meisten Angaben über den Zusammenhang zwischen den Längen von (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten und den Absorptionsmaxima ihrer Iodkomplexe sind miteinander nicht vergleichbar, da die Lage der Maxima vor allem durch die Konzentration an Kaliumiodid beeinflusst wird²⁴. Die in dieser Arbeit erhaltenen Werte, die unter gleichen Bedingungen erhalten wurden, sind jedoch miteinander vergleichbar^{25,26}.

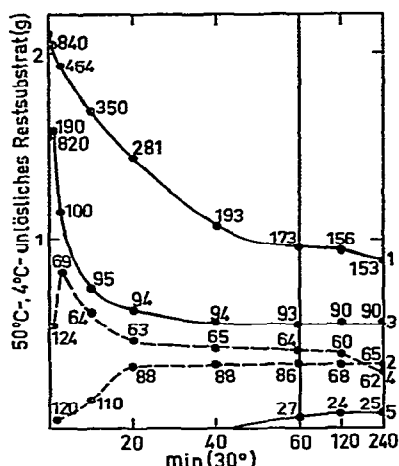


Abb. 3. Fraktionierung der Restsubstrate aus AmS₁ und AmS₂. Für die Fraktionierung siehe Experimenteller Teil bzw. Zit. 1. Kurven 1 und 3: bei 50° unlösliche Anteile der Restsubstrate aus AmS₁ bzw. AmS₂. Kurven 2 und 4: Bei 4° unlösliche Anteile der Restsubstrate aus AmS₁ bzw. AmS₂. Kurve 5: Im 4°-Überstand nachweisbare (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten aus AmS₂. Die Zahlen über den Messpunkten geben die ermittelten \bar{P}_n -Werte an.

Bei AmS₂ nehmen die Mengen an dem bei 50°- und dem bei 4°-unlöslichen Material unter signifikanter Kettenverkürzung in der initialen Phase der Transferreaktion zunächst zu. Die \bar{P}_n -Werte pegeln sich bei der 50°-unlöslichen Amylosefraktion auf 95–100, bei der 4°-unlöslichen auf ~ 60 ein (Abb. 3, Kurven 3 und 4). Während in den 4°-Überständen von AmS₁ kürzere (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten nicht nachzuweisen sind, können in den Überständen von AmS₂ in den zu späteren Zeitpunkten gezogenen Proben kleine Mengen an Ketten mit durchschnittlichen Längen um 26 bestimmt werden (Abb. 3, Kurve 5).

Mit AmB erhielten wir gleiche Resultate wie mit AmS. Es kann deshalb darauf verzichtet werden, näher auf diese Versuchsserie einzugehen.

Zeitlicher Verlauf der (1→4)- α -D-Glucopyranosyltransferreaktionen mit Amylose Roth (AmR) und Amylose aus Kartoffelstärke (AmK). — Bei einer Anfangskonzentration des Substrates AmR von 1,8% ($\sim 0,195$ mm) ist für die initiale Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamylose ein Wert von $4,8 \text{ kat} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Protein}$ zu bestimmen (Abb. 4, Kurve 1). Im Gegensatz zu den Ansätzen mit AmS und AmB sinken die \bar{P}_n -Werte des entsprechend der Bildung von Cyclohexaamylose abnehmenden Substrates (Abb. 4, Kurve 2) nur geringfügig und nehmen im Verlauf der weiteren Inkubation zu. Die Fraktionierung der aus den Zeitproben zurückgewonnenen Restsubstrate ergibt, daß deren löslicher Anteil im Verlauf 40 min Inkubation stetig zunimmt (Tab. I). Die Wasserlöslichkeit der aus der späteren Phase der Transferreaktion zurückgewonnenen Restsubstrate, ihre zu ermittelnden \bar{P}_n -Werte und die Absorptionsmaxima ihrer Iodkomplexe stimmen für Amylosen nicht überein und unterscheiden sich grundsätzlich von den für AmS und AmB erhaltenen Daten. Es lag der Schluss nahe, daß AmR durch grössere Mengen an Amylopektin verunreinigt

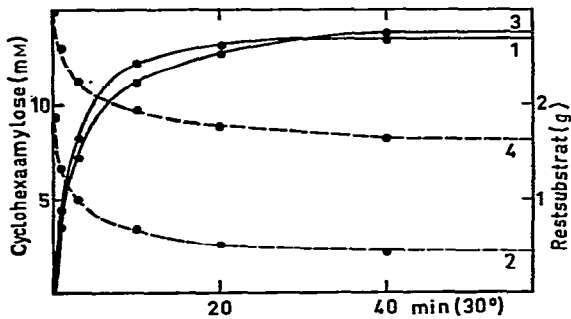


Abb. 4. Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamylose und zeitabhängiger Substratumsatz mit Amylose Roth (AmR) und Amylose aus Kartoffelstärke (AmK) im Verlauf von 60 min Inkubation (30°). Anfangskonzentration der Substrate 1,8% (AmR) und 3% (AmK), 14 mg CTG/L. Für die Aufarbeitung siehe Experimenteller Teil bzw. Zit. 1. Kurven 1 und 3: Verlauf der Zunahme an Cyclohexaamylose mit AmR bzw. AmK. Kurven 2 und 4: Substratumsatz mit AmR bzw. AmK.

TABELLE I

ZEITABHÄNGIGER SUBSTRATUMSATZ MIT AmR UND CHARAKTERISIERUNG DER AUS DEN ZEITPROBEN ZURÜCKGEWONNENEN RESTSUBSTRATE^a

Inkubationszeit (min)	Restsubstrat (mg) ^b	β -Amylolyse (%) ^c	Fraktionierung, bei 50° und 4°		Entzweigung ^{b,d}
			Löslich (mg)	Unlöslich ^b (mg)	
0 (Kontr.)	1830[580]	71	384(617)	1446(607)	
1	1230[575]	62	467(602)	763(595)	
3	930[550]	57	428(605)	502(578)[600] → [99](597)	
10	620[595]	39	329(604)	291(576)	
20	460[640]				
	(587)	34	313(594)	147	
40	370[740]	31,3	315(593)	55	
	(585)		[760]	→	[54](594)

^aFür die Fraktionierung der Restsubstrate und die Herstellung ihrer Iodkomplexe siehe Experimenteller Teil. ^bIn eckigen Klammern ermittelte \bar{P}_n -Werte; in runden Klammern, Absorptionsmaxima der Iodkomplexe (nm). ^cZur β -Amylolyse wurden 20 mg Substrat mit 10 μ g β -Amylase in 50 mL 60mM Citratpuffer, pH 6,2, bei 30° solange inkubiert, bis keine Zunahme an reduzierenden Aldehydgruppen mehr festzustellen war. Der Prozentsatz der β -Amylolyse errechnet sich aus den pro mg Substrat gebildeten Mengen an Maltose. ^dZur Entzweigung wurden die aus den Restsubstraten erhaltenen Fraktionen (500 mg) mit 20 Isoamylase-Einheiten in 100 mL 60mM Acetatpuffer, pH 3,6, 20 h bei 30° inkubiert.

ist. Neben der Viskositätsbestimmung ist der Grad der β -Amylolyse ein wichtiges Kriterium zur Charakterisierung einer Amylose (70–90% β -Amylolyse für verschiedene reine Amylosen^{12,15}). Im Gegensatz zu AmS (86–88% β -Amylolyse) wird AmR nur zu 71% durch β -Amylase abgebaut. Der Grad der β -Amylolyse des aus den Zeitproben der Transferansätze zurückgewonnenen Restsubstrates verringert sich stetig (Tab. I). Die bei 50°-unlösliche Fraktion des nach 3 min Inkubation zurückgewonnenen sowie der lösliche Anteil des nach 40 min Inkubation zurück-

gewonnenen Restsubstrates wurden mit Isoamylase inkubiert (Tab. I). Die Bestimmung der \bar{P}_n -Werte nach der Entzweigung ergibt, daß die unlösliche Fraktion pro Molekül 6, die lösliche Fraktion pro Molekül 14 α -D-(1 \rightarrow 6)-glucosidische Bindungen enthält*.

Es war zu erwarten, daß die Transferreaktion mit AmK wie mit AmR verläuft, da wir wissen, daß AmK noch etwa 15% an Amylopektin enthält. Bei einer Anfangskonzentration dieses Substrates von 3% ($\sim 0,12$ mm) beträgt v_i für Cyclohexaamylose 4,2 kat \cdot kg $^{-1}$ Protein (Abb. 4, Kurve 3). Die \bar{P}_n -Werte des aus den Zeitproben zurückgewonnenen Restsubstrates (Abb. 4, Kurve 4) steigen im Verlauf 40 min Inkubation auf über 3000 an, die Absorptionsmaxima der Iodkomplexe verschieben sich von 630 nm (Kontrolle) in den kürzerwelligen Bereich des Spektrums um 570 nm.

Zeitlicher Verlauf der (1 \rightarrow 4)- α -D-Glucopyranosyltransfer-Reaktionen mit Kartoffelstärke und Amylopektin. — Wie einleitend erwähnt, werden die viskosen Lösungen beider Polymere ("Gele") durch die CGT sehr rasch verflüssigt^{8,9}. Diese Verflüssigung, die mit einer hydrolytischen Aktivität des Enzyms in Zusammenhang gebracht wurde¹⁰, ist bei 3,5%igen Lösungen unter den von uns angewandten Bedingungen nach etwa 70 s Inkubation erreicht.

Die Konstante v_i für Cyclohexaamylose ist mit Kartoffelstärke zu 2,7 kat \cdot kg $^{-1}$ Protein zu bestimmen, die maximale Konzentration an dem Cyclodextrin ist nach 60 min Inkubation mit 13,2mm erreicht (Abb. 5A, Kurve 1). Nach 40 min Inkubation sind noch 62% des eingesetzten an Restsubstrat nachzuweisen (Abb. 5, Kurve 2).

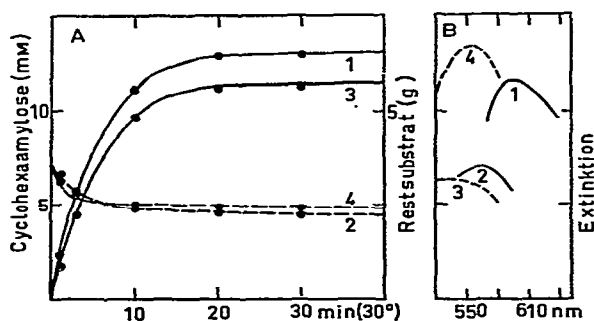


Abb. 5. Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamylose und zeitabhängiger Substratumsatz mit Kartoffelstärke und Amylopektin im Verlauf von 40 min Inkubation (30°). Anfangskonzentration der Substrate 3,5%, 14 mg CGT/L. Für die Aufarbeitung siehe Experimenteller Teil bzw. Zit. 1. A, Kurven 1 und 3: Verlauf der Zunahme an Cyclohexaamylose mit Kartoffelstärke bzw. Amylopektin, Kurven 2 und 4: Substratumsatz mit Kartoffelstärke bzw. Amylopektin. B, Absorptionsspektren der Iodkomplexe: (1) Kartoffelstärke (Kontrolle), (2) Kartoffelstärke (Restsubstrat nach 20 min Inkubation), (3) Amylopektin (Kontrolle), (4) Amylopektin (Restsubstrat nach 3 min Inkubation).

*Auch bei AmS verringert sich der Grad der β -Amylyolyse im Verlauf der Inkubation geringfügig: Die aus der Zeitprobe 180 min zurückgewonnene Restamylose wird nur mehr zu 80% durch β -Amylase abgebaut. Während in AmS selbst eine Spaltung von α -D-(1 \rightarrow 6)-glucosidischen Bindungen durch Isoamylase exakt nicht nachzuweisen ist, lässt sich in dem nach 60 min Inkubation erhaltenen Restsubstrat pro Molekül 1 α -D-(1 \rightarrow 6)-glucosidische Bindung bestimmen.

TABELLE II

ZEITABHÄNGIGER SUBSTRATUMSATZ MIT KARTOFFELSTÄRKE UND CHARAKTERISIERUNG DER AUS DEN ZEITPROBEN ZURÜCKGEWONNENEN RESTSUBSTRATE^a

Inkubations- zeit (min)	Restsubstrat ^c (mg)	Fraktionierung, bei 50° und 4°		Entzweigung, bei 4° ^{b,c}	
		Unlöslich (mg)	Löslich (mg) ^c	Unlöslich (mg)	Löslich (mg)
0 (Kontr.)	3500(626) ^c				
1,2	3200(597)				
3	2900(592)				
10	2450(581)	200	2250(582)	1570(598)	680
			[~ 6500] →	[46]	[11,8]
20	2300(562)	23	2280(564)	1700(586)	580
			[~ 6500] →	[37,4]	[9,8]
40	2240(561)				

^aFür die Fraktionierung der Restsubstrate und die Herstellung ihrer Iodkomplexe siehe Experimenteller Teil. ^bZur Entzweigung wurden die aus den Restsubstraten erhaltenen, bei 50°- und 4°-löslichen Fraktionen (500 mg) mit 20 Isoamylase-Einheiten in 100 mL 60mM Acetatpuffer, pH 3,6, 20 h bei 30° inkubiert. ^cIn runden Klammern, Absorptionsmaxima der Iodkomplexe; in eckigen Klammern, ermittelte \bar{P}_n -Werte.

Bis zu 10 min Inkubation steigen die Reduktionswerte der aus den Zeitproben zurückgewonnenen Restsubstrate leicht an, bei den zu späteren Zeitpunkten der Inkubation zurückgewonnenen Restsubstrate sind keine reduzierenden Aldehydgruppen mehr zu bestimmen. Die Absorptionsmaxima der Iodkomplexe verschieben sich mit zunehmender Inkubationsdauer in den kürzerwelligen Bereich des Spektrums (Tab. II), wobei die Absorptionspeaks flacher werden (Abb. 5B, Kurven 1 und 2). Es war anzunehmen, daß es sich bei den aus den späteren Zeitproben zurückgewonnenen Restsubstrate um Amylopektin handelt. Die nach 10 min bzw. nach 20 min Inkubation erhaltenen Restsubstrate wurden durch Isoamylase entzweigt (Tab. II). Nach der Entzweigung erhält man den grössten Teil der Restsubstrate als bei 4° unlösliche (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten mit \bar{P}_n -Werten von 46 ($t_{10 \text{ min}}$ Restsubstrat) bzw. 37,4 ($t_{20 \text{ min}}$ Restsubstrat).

Bei einer Anfangskonzentration von 3,5% Amylopektin beträgt v_i für Cyclohexaamylose 2,1 kat · kg⁻¹ Protein, die maximale Konzentration an dem zyklischen Transferprodukt ist nach 40 min Inkubation mit 11,2mM erreicht (Abb. 5A, Kurve 3). Nach dieser Inkubationszeit sind noch 64% des eingesetzten an Restsubstrat zu bestimmen (Abb. 5A, Kurve 4). Reduzierende Aldehydgruppen sind in keinem der aus den Zeitproben zurückgewonnenen Restsubstrate nachzuweisen. Die Absorptionsmaxima ihrer Iodkomplexe verschieben sich geringfügig in den längerwelligen Bereich des Spektrums. Gleichzeitig vergrössern sich Iodbindungskapazität und damit die Extinktionswerte (Tab. III und Abb. 5B, Kurven 3 und 4). Nach der Entzweigung des aus den Zeitproben $t_{70 \text{ s}}$ und $t_{20 \text{ min}}$ zurückgewonnenen Restsubstrates bzw. einer Amylopektin-Kontrolle mit Isoamylase erhält man das folgende Verteilungsmuster der linearen (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten (Tab. III): Der Prozentsatz

TABELLE III

ZEITABHÄNGIGER SUBSTRATUMSATZ MIT AMYLOPEKTIN UND CHARAKTERISIERUNG DER AUS DEN ZEITPROBEN ZURÜCKGEWONNENEN RESTSUBSTRATE

Inkubationszeit (min)	Restsubstrat (mg) ^b	Extinktion	Entzweigung, Methanol-Fraktionierung ^a		
			In 60% Methanol		
			Unlöslich Bei 4°	Löslich (mg) ^c	
			Unlöslich (mg) ^c	Löslich (mg) ^c	
0 (Kontr.)	3500(532)	0,28	700[37,5]	1880[18,2]	920[13,4]
1,2	2850(547)	0,66	627[40,3]	1112[21]	1111[10,2]
3	2700(551)	0,71			
10	2460(553)	0,82			
20	2360(553)	0,87	566[41]	567[21,6]	1227[9,5]
40	2300(553)	0,89			

^aZur Entzweigung wurden die Restsubstrate (500 mg) mit 20 Isoamylase-Einheiten in 100 mL 60mM Acetatpuffer, pH 3,6, 20 h bei 30% inkubiert. Die in 60% Methanol unlöslichen Anteile des entzweigten Materials wurden durch Zentrifugation abgetrennt und in Wasser gelöst. Aus der wässrigen Lösung wurde das bei 4° unlösliche Material abzentrifugiert. ^bIn runden Klammern, Absorptionsmaxima der Iodkomplexe (nm). Für die Herstellung der Iodkomplexe siehe Experimenteller Teil.

^cIn eckigen Klammern, ermittelte \bar{P}_n -Werte.

an kürzeren Ketten nimmt mit der Inkubationsdauer zu. Ebenso vergrößert sich im Vergleich zur Kontrolle der Anteil an längeren (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten.

Bildung von Maltooligosacchariden im Verlauf der von der CGT mit den hochmolekularen Substraten katalysierten (1→4)- α -D-Glucopyranosyltransfer-Reaktionen. — Nach den mit der Versuchsserie AmS₂ erhaltenen Ergebnissen sollten in den Transferansätzen reduzierende kleinere Transferprodukte, die theoretisch nach Gleichungen¹ (1) und (2) entstehen könnten, zumindest in der Anfangsphase der Transferreaktionen nicht nachzuweisen sein. Das in den Zeitproben der Ansätze AmS₁ und AmS₂ nach Abtrennung der Restsubstrate bzw. der Cyclohexaamylose zu bestimmende Anthron-positive Material besteht zu 64% aus einem durch fraktionierte Acetonfällung abzutrennenden Kohlenhydrat, für das \bar{P}_n -Werte >60 zu ermitteln sind. Da dieses Material keinerlei "Iodfarbe" zeigt (es enthält keine zyklischen Transferprodukte) und offensichtlich kein Substrat für β -Amylase bzw. für Amyloglucosidase ist, kann angenommen werden, daß es sich dabei um eine Nicht-Stärke-Verunreinigung des Amylose-Präparats handelt. Für das verbleibende Anthron-positive Material der Überstände ist in allen Fällen ein \bar{P}_n -Wert von 13 zu ermitteln.

Unter Zugrundelegung dieser durchschnittlichen Kettenlängen nimmt die Konzentration an dieser Saccharidfraktion bei AmS₁ von 0,04mM nach 1 min Inkubation im Verlauf von 20 min Inkubation auf 0,28mM zu und bleibt dann annähernd konstant. Bei AmS₂ ist nach 1 min Inkubation eine Konzentration von

0,44mm zu bestimmen. Bei dieser Saccharidfraktion handelt es sich, wie das Chromatogramm zeigt, noch weitgehend um Reste der vorgelegten Maltooligosaccharide. Im Verlauf der Inkubation sinkt die Konzentration auf einen annähernd konstant bleibenden Wert von 0,29mm ab. Chromatographisch lassen sich neben höheren Sacchariden Spuren an Zuckern nachweisen, die sich wie D-Glucose bzw. wie Homologe der Maltosaccharidreihe Glc₂ bis Glc₈ verhalten. Die mit den anderen Substraten erhaltenen Befunde entsprechen den für AmS mitgeteilten, so daß im einzelnen darauf nicht weiter eingegangen zu werden braucht.

DISKUSSION

Unsere Versuche zeigen, daß die annähernd reinen Amylosen AmS und AmB hinsichtlich der Zyklisierung zu Cyclohexaamylose relativ schlechte Substrate für die CGT von *K. pneumoniae* M 5 a1 sind. Erst nach einer primär erfolgreichen Verkürzung der Amyloseketten, die durch Zugabe von Maltooligosacchariden signifikant beschleunigt wird, verläuft die Zyklisierungsreaktion mit maximaler Geschwindigkeit*. Es ist naheliegend, eine Abhängigkeit der Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamylose von der Anzahl der vorliegenden nicht reduzierenden Kettenenden anzunehmen. Deren Gesamtmenge erhöht sich (entsprechend der Erhöhung der molaren Konzentration des Restsubstrates) in der initialen Phase der Transferreaktion aufgrund der festzustellenden Kettenverkürzung. Aus der graphischen Darstellung von $1/(S)$ gegen $1/v$ nach Lineweaver und Burk²⁷ ergibt sich jedoch keine lineare Abhängigkeit der Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamylose von der Substratkonzentration (Masszahl für die nicht reduzierenden Kettenenden bei linearen Substraten). Eine Gerade erhält man jedoch bei der graphischen Darstellung von $1/v$ gegen $1/(S')$, wobei (S') der Konzentration an den aus den Zeitproben von AmS₁ bis 15 min Inkubation bzw. AmS₂ nach 1 min Inkubation erhaltenen, bei 50° löslichen, aber bei 4° unlöslichen Anteile der Restsubstrate entspricht (Abb. 6). Demnach scheinen für die Zyklisierungsreaktion offensichtlich Ketten < Glc₁₀₀ erforderlich. Mit dieser Folgerung nähern wir uns wieder der früheren Vermutung, daß ein Zusammenhang zwischen der helikalen Konformation des Substrates und der Zyklisierungsreaktion bestünde^{28,29}: Während die langkettigen Amylosemoleküle in wässriger Lösung als lockere, langgestreckte Helices vorliegen³⁰⁻³³, sollen kürzere Amyloseketten (Glc₅₀-Glc₈₀) auch in wässriger Lösung eine offensichtlich stabilere Helix bilden³⁴. Aus der graphischen Darstellung von $1/v$ gegen $1/(S')$ (Abb. 6) ergäbe sich für (1→4)-α-D-Glucopyranosylketten $\bar{P}_n \sim 70$ für V ein Wert von 2 kat ·

*Die im Verlauf der Inkubation einsetzende Trübung und Verdickung der Transferansätze mit AmS und AmB ist demnach eine Folge der einsetzenden Kettenverkürzung (zur Übersicht siehe Zit. 13, 15). Da wir nicht wissen, ob vor allem in der späteren Phase der Transferreaktionen die für die Umsetzungen effektive (lösliche) Substratkonzentration der insgesamt bestimmbar entspricht, soll darauf verzichtet werden, auf Gleichgewichtslagen zwischen linearen und zyklischen Transferprodukten sowie auf die Ausbeuten an Cyclohexaamylose in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ausführlicher einzugehen.

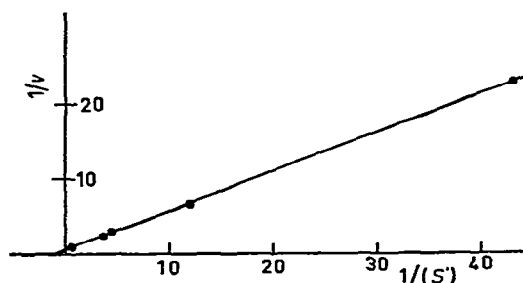


Abb. 6. Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamylose in Abhängigkeit der Konzentration an 50° löslichem, 4° unlöslichem Material der Restsubstrate (S'). Darstellung von $1/v$ gegen $1/(S')$ nach Zit. 27. Für die Berechnung liegen die bei AmS_1 bis 15 min bzw. bei AmS_2 nach 1 min Inkubation ermittelten Werte zugrunde. Für die Fraktionierung der Restsubstrate siehe Experimenteller Teil.

kg^{-1} Protein. Da mit (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten \bar{P}_n 16 für V 6,2 $kat \cdot kg^{-1}$ Protein ermittelt wurden¹, scheint die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (bezogen auf die Anzahl der nicht reduzierenden Kettenenden) mit den beiden Substraten nicht wesentlich zu differieren. Die rapide Verkürzung der Amyloseketten in den Transferansätzen AmS_2 ist durch Disproportionierungsreaktionen¹ (2) zwischen den Amyloseketten und den Maltooligosacchariden gut erklärbar, wobei entsprechend der "Kupplungsreaktion"¹ (1) die Maltooligosaccharide allerdings mit grosser Effektivität als "Akzeptoren" langer Kettenreste fungieren müssen: Die Fraktionierung der Restsubstrate zeigt, daß in der initialen Phase der Transferreaktion der Gehalt an Amyloseketten mit \bar{P}_n -Werten von 70 sprunghaft ansteigt, während zum gleichen Zeitpunkt von den vorgelegten Maltooligosacchariden nur noch Spuren nachzuweisen sind. Eine Erklärung für die Kettenverkürzung in den Ansätzen AmS_1 muss im Augenblick spekulativ bleiben. Die Disproportionierung des hochmolekularen Substrates selbst kann ausgeschlossen werden, da auch nach Fraktionierung der Restsubstrate keine signifikant längeren Amyloseketten ermittelt werden können und die Kettenverkürzung schneller erfolgt, als sie durch Disproportionierung bzw. aufgrund von Zyklisierungsreaktionen erklärbar wäre. Geht man davon aus, daß das Amylosepräparat keine als "Akzeptoren" dienende Saccharide enthält (auch eine Fraktionierung von AmS liefert keine Hinweise auf das Vorhandensein einer solchen Verunreinigung), so bleiben zwei Möglichkeiten für die Erklärung: (a) Bei einem Gleichgewicht zwischen der zyklischen und der linearen Form eines Enzym-gebundenen Maltohexaosylrestes könnte dieser in linearer Form als "Akzeptor" für die Disproportionierungsreaktion dienen. (Amylosen sind polydispers, d.h. auch AmS wird kürzere Ketten enthalten, die für Zyklisierungsreaktionen geeignet sind; in der Tat lassen sich auch in der initialen Phase der Transferreaktion mit AmS_1 geringe Mengen an Cyclohexaamylose bestimmen). (b) Wie früher bereits vermutet^{2,10-12}, besitzt die CGT hydrolytische Aktivität. Wir werden diese Frage noch eingehender zu prüfen haben.

Für das hinsichtlich des Verlaufs der Zyklisierungsreaktion völlig andere Verhalten mit den Substraten AmR und AmK können die im Vergleich zu AmS unterschiedlichen \bar{P}_n -Werte nicht als Erklärung dienen. Alle erhaltenen Befunde lassen keinen anderen Schluss zu, als daß die nicht reduzierenden Kettenenden der in diesen Amylosepräparaten nachzuweisenden Amylopektin-Verunreinigungen als "Akzeptoren" für die Disproportionierung nach Gleichung¹ (2) fungieren, um die für die Zyklisierung erforderlichen Kettenlängen (sowohl verkürzte Amyloseketten wie auch die entsprechend verlängerten äusseren Ketten des Amylopektins) bereitzustellen. Diese Annahme wird durch die mit Kartoffelstärke und Amylopektin erhaltenen Ergebnisse erhärtet: Alle bisher untersuchten Amylopektine enthalten nach Entzweigung eine kleinere Population an längeren linearen (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten, z.B. Maniok-Stärke etwa 13% der gesamten linearen Ketten (unit chains) mit einem \bar{P}_n -Wert^{35,36} von 45. Bei dem aus unseren Transferansätzen mit Kartoffelstärke zu isolierenden wasserlöslichen Restsubstrat kann es sich demnach nicht um natives Amylopektin handeln. Unter der berechtigten Annahme, daß das Material keine Amyloseketten mehr enthält, kann geschlossen werden, daß es sich um ein Amylopektin handelt, dessen äussere Ketten durch Transferreaktionen aus Amylose verlängert wurden*.

Es wäre damit möglich, mit Hilfe der CGT aus Stärke mit etwa 60% Ausbeute ein *quasi* weniger hoch verzweigtes Amylopektin herzustellen. Mit der rapiden Abnahme des Amylose-Anteils und der Änderung der Molekülstruktur von Amylopektin kann die schnelle Verflüssigung eines Stärkegels erklärt werden. Auch die Ergebnisse der mit Amylopektin durchgeführten Transferansätze sprechen dafür, daß die CGT parallel zur Zyklisierung einen Transfer linearer Teilstücke zwischen den Ketten des Amylopektins katalysiert. Wie bei der Gesamtstärke mag diese Umstrukturierung Ursache für die Verflüssigung eines Amylopektingels sein.

Bei allen, mit den hochmolekularen Substraten durchgeführten Transferansätzen sind auch nach mehrstündiger Inkubation höchstens Spuren an reduzierenden, niedermolekularen Transferprodukten nachzuweisen. Dieses Ergebnis deckt sich mit der in der vorhergehenden Arbeit¹ gemachten Feststellung, daß die Gesamtmenge an Maltooligosacchariden mit zunehmender Kettenlänge des Substrates abnimmt.

DANK

Die hier durchgeführten Untersuchungen wurden mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (Be 789/1).

*Über die Transferreaktionen der CGT mit verzweigten α -D-Glucanen soll an anderer Stelle ausführlicher berichtet werden. Es werden deshalb nur Daten angegeben, die für das Verständnis der dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragestellung von Bedeutung sind. Es sollte erwähnt werden, daß die nach der Entzweigung zu ermittelnden \bar{P}_n -Werte der linearen (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten mit grösster Wahrscheinlichkeit nicht durch "D-Glucose-Stubs", die von der Isoamylase nicht abgespalten werden können, verfälscht werden.

LITERATUR

- 1 H. BENDER, *Carbohydr. Res.*, 78 (1980) 133–145.
- 2 D. FRENCH, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 12 (1957) 189–260.
- 3 R. W. KERR, *J. Am. Chem. Soc.*, 65 (1943) 188–193.
- 4 E. J. WILSON, JR., T. J. SCHOCH UND C. S. HUDSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 65 (1943) 1380–1383.
- 5 F. CRAMER UND D. STEINLE, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 595 (1955) 81–100.
- 6 J. A. DEPINTO UND L. L. CAMPBELL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 125 (1968) 253–258.
- 7 S. KITAHATA UND S. OKADA, *Agric. Biol. Chem.*, 39 (1975) 2185–2191.
- 8 A. G. LANE UND S. J. PIRT, *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 21 (1971) 330–334.
- 9 H. BENDER, *Arch. Microbiol.*, 111 (1977) 271–281.
- 10 S. KOBAYASHI, K. KAINUMA UND S. SUZUKI, *Carbohydr. Res.*, 61 (1978) 229–238.
- 11 J. A. THOMA UND L. STEWART, in R. L. WHISTLER UND E. F. PASCHALL (Eds.), *Starch: Chemistry and Technology*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1965, ss. 209–249.
- 12 D. FRENCH, *M.T.P. Int. Rev. Sci. Org. Chem. Ser. Five, Carbohydr.*, (1975) 267–235.
- 13 J. F. FOSTER, in R. L. WHISTLER UND E. F. PASCHALL (Eds.), *Starch: Chemistry and Technology*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1965, ss. 349–391.
- 14 G. K. ADKINS UND C. T. GREENWOOD, *Carbohydr. Res.*, 11 (1969) 217–224.
- 15 C. T. GREENWOOD, in W. PIGMAN UND D. HORTON (Eds.), *The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry*, Vol. IIB, Academic Press, New York, 1970, ss. 471–513.
- 16 H. BENDER, *Arch. Microbiol.*, 113 (1977) 49–56.
- 17 K. YOKOBAYASHI, A. MISAKI UND T. HARADA, *Biochim. Biophys. Acta*, 212 (1970) 458–469.
- 18 T. HARADA, K. YOKOBAYASHI UND A. MISAKI, *Appl. Microbiol.*, 16 (1968) 1439–1444.
- 19 R. G. SPIRO, *Methods Enzymol.*, 8 (1966) 3–36.
- 20 F. J. VILES UND L. SILVERMAN, *Anal. Chem.*, 21 (1949) 950–953.
- 21 N. NELSON, *J. Biol. Chem.*, 153 (1949) 375–380.
- 22 Z. GUNJA-SMITH, J. J. MARSHALL UND E. E. SMITH, *FEBS Lett.*, 13 (1971) 309–311.
- 23 A. KEESTON, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc. Meet.*, 129 (1956) 31C.
- 24 S. ONO, S. TSUCHIHASHI UND T. KUGE, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 3601–3602.
- 25 R. R. BALDWIN, R. S. BEAR UND R. RUNDLE, *J. Am. Chem. Soc.*, 66 (1944) 111–115.
- 26 B. PFANNEMÜLLER, *Carbohydr. Res.*, 61 (1978) 41–52.
- 27 H. LINEWEAVER UND D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658–666.
- 28 K. MYRBÄCK UND L. G. GJÖRLING, *Ark. Kem. Mineral. Geol., Ser. A*, 20 (1945) 1–13.
- 29 C. F. CORI, *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 4 (1945) 226.
- 30 M. B. SENIOR UND E. HAMORI, *Biopolymers*, 12 (1973) 65–78.
- 31 J. SZEJTLI UND S. AUGUSTAT, *Staerke*, 18 (1966) 38–42.
- 32 W. BANKS UND C. T. GREENWOOD, *Carbohydr. Res.*, 7 (1968) 349–356.
- 33 Q. T. NGUYEN, P. APTEL UND J. NEEL, *Biopolymers*, 15 (1976) 2097–2100.
- 34 B. PFANNEMÜLLER, H. MAYERHOFER UND R. C. SCHULZ, *Biopolymers*, 10 (1971) 243–261.
- 35 L. F. HOOD, *Carbohydr. Res.*, 61 (1978) 53–66.
- 36 Z. GUNJA-SMITH, J. J. MARSHALL, C. MERCIER, E. E. SMITH UND W. J. WHELAN, *FEBS Lett.*, 12 (1970) 101–104.