

DIE BIOSYNTHESE DER STÄRKE, I*

SYNTHESE DER AMYLOSE MIT PHOSPHORYLASE

Von

J. HOLLÓ, E. LÁSZLÓ und Á. HOSCHKE

Lehrstuhl für Landwirtschaftlich-Chemische Technologie
der Technischen Universität, Budapest

(Eingegangen am 23. März, 1964)

I. Einleitung

In den letzteren Jahren haben sich mehrere Forscher mit der »in-vitro«-Synthese der Amylose, also der Stärkekomponente von nicht abzweigender Struktur befaßt. Die Synthese wurde nach drei Methoden durchgeführt; es wurden verwendet:

- a) Phosphorylase-Enzym und Glukose-1-Phosphat,
- b) Uridindiphosphat-Glukose und sog. Stärke-Synthetase-Enzym,
- c) D-Enzym und Maltooligosen.

Um die Rolle der drei Enzyme »in vivo« zu klären, setzten wir uns die Aufgabe, die Eigenschaften der auf dreierlei Weise synthetisierbaren Amylose zu vergleichen. In unserer vorliegenden Abhandlung befassen wir uns mit der Darstellung der Phosphorylase und der mit ihrer Hilfe synthetisierbaren Amylose.

HANES [1] untersuchte als erster die Gleichgewichtsreaktion von Glukose-1-Phosphat \rightleftharpoons Stärke + anorganisches Phosphat. Diese Reaktion schreitet solange nach einer Richtung voran, bis das Verhältnis des anorganischen Phosphats und des Esterphosphats einen Wert erreicht, der von der Veränderung der Stärke- und der Esterphosphatkonzentration nicht mehr beeinflußt wird. Der Gleichgewichtsquotient hängt von der Wasserstoffionenkonzentration ab.

Der Mechanismus der Synthese ist folgender:

- a) $(C_6H_{10}O_5)_x + G-1-P \rightarrow (C_6H_{10}O_5)_{x+1} + \text{Phosphat}$,
- b) $(C_6H_{10}O_5)_{x+1} + G-1-P \rightarrow (C_6H_{10}O_5)_{x+2} + \text{Phosphat}$.

Bei den Bindungen handelt es sich zur Gänze um α -1,4 Glukosidbindungen. Die Kette wächst auf Wiederholung dieses Prozesses bis zum Erreichen eines Grenzwertes. Die Konversion von Glukose-1-Phosphat zu Polysaccharid und

* 51. Mitteilung des Lehrstuhls über die Untersuchung von Polysacchariden. Die Untersuchungen wurden im Rahmen der technisch-wissenschaftlichen Zusammenarbeit mit dem Institut für Ernährung der Deutschen Akademie der Wissenschaften, Berlin, durchgeführt.

anorganischem Phosphat zwischen p_H 6—7 ist etwa 80%ig. Die Reaktion ist bimolekular, aber kinetisch erstklassig. CORI und Mitarbeiter [2] fanden, daß zur Synthese der Amylose außer dem Glukose-1-Phosphat auch sog. »Starter«-Moleküle erforderlich sind. Nach HIDY und DAY [3] hängt die Aktivität des Starters von der Zahl der nicht reduzierenden Kettenenden ab: der Starter braucht keine Abzweigung zu enthalten, und zum Aktivieren der Synthese genügen 6—8 Glukose-Einheiten je Molekül. Später stellten WEIBULL und TISELIUS [4] fest, daß bei der Amylosesynthese die Maltotriose jener Starter ist, der die wenigsten Glukose-Einheiten enthält. Nach WHELAN und BAILEY [5] wirkt sich die Auswahl des Starters auf die Polydispersität der synthetischen Amylose aus. WHELAN und seine Mitarbeiter bestimmten bei ihren Untersuchungen über das Ausmaß der Synthese im Phosphorylase-Starter-Komplex die Michaelis-Menten-Konstante. Sie stellten fest, daß der reziproke Wert der Reaktionsgeschwindigkeit der Konzentration des Starters direkt-proportional ist. Auch dies ist ein Beweis dafür, daß die Reaktion der Synthese bimolekular ist, und daß sich der Starter in der Reaktion als Normal-Substrat benimmt.

Die Frage nach dem Mechanismus der Synthese ob es sich um einen Ein- oder Mehrketten-Mechanismus handelt, ist noch nicht entschieden. Jedenfalls ist die Mitteilung WHELANS interessant, daß die Synthese beim Gebrauch der Maltotriose als Starter nach dem Einketten-Mechanismus erfolgt. Die α -Amylase und auch die β -Amylase greifen die derart synthetisierte Amylose nur schwer an. Dies erfuhr er nur bei der Maltotriose [6]. Nach HUSEMANN [7] spielt sich die Phosphorylase und β -Amylase der natürlichen Amylose nach dem Einketten-Mechanismus, die der synthetischen Amylose mit hohem Polymerisationsgrad hingegen nach dem Mehrketten-Mechanismus ab.

2. Darstellung des Phosphorylase-Enzyms

Die verschiedenen Forscher bemühten sich, Verfahren auszuarbeiten, die als Endprodukt ein reines oder der Muskelphosphorylase ähnlich kristallisiertes Enzym von großer spezifischer Aktivität liefern. Dies ist bisher überzeugend noch niemand gelungen.

Zuerst erzeugten HANES [8], dann GREEN und STUMPF [9], HIDY und DAY [10], WEIBULL und TISELIUS [4] Enzyme durch Fraktionieren des Kartoffelsafts mit Ammoniumsulfat. Später stellten BARKER und seine Mitarbeiter [11] Enzym durch Fällern mit Bleiazetat und Fraktionieren mit Ammoniumsulfat dar. BAUM und GILBERT [12] gewannen als erste »kristallisierte« Phosphorylase durch Adsorption auf retrogradierter Amylose, hatten aber dabei eine so kleine Ausbeute, daß sie an ihr nicht einmal die Enzymaktivität messen konnten. Übrigens haftet diesen Methoden ganz allgemein der Mangel

an, daß sie weder die Veränderung der spezifischen Aktivität während der Reinigung, noch die spezifische Aktivität der Endprodukte mitteilen. YA-PIN-LEE konnte das BAUM—GILBERT-Verfahren nicht wiederholen, es gelangte ihm jedoch, durch Elektrophorese einer Zellulose-Kolonie ein Enzym von hoher spezifischer Aktivität zu erhalten, doch war dieses nicht kristallisiert [13].

Nach den Untersuchungen HUSEMANNs kann synthetische Amylose nur aus einem amylasefreiem Enzympräparat gewonnen werden, weshalb der Kartoffelsaft zur Inaktivierung der Amylase vor dem Fraktionieren mit Ammoniumsulfat auf 54—56° C erwärmt werden muß [14].

Im Laufe unserer Versuche erprobten wir mehrere Methoden. Wir konnten hierbei die Kartoffel Phosphorylase unter Modifikation und Kombination der Methoden von BARKER, BOURNE, WILKINSON und PEAT sowie von HUSEMANN darstellen.

Die Kartoffeln hielten wir nach dem Abschälen und Zerschneiden 20 Minuten lang unter 0,5%igem Natriumdithionit, wodurch die Phenoloxylase inhibiert wird, worauf wir sie nach gründlichem Auswaschen in Breiform brachten und den Kartoffelsaft durch ein Leinwandfilter rasch hindurchpreßten. Danach zentrifugierten wir die Suspension ab und warfen die Fällung weg. Das p_H der Supernatante stellten wir mit 0,02n Natriumhydroxyd auf 7,2 ein und setzten eine Bleiazetatlösung zu (30 ml Bleiazetat/100 ml Kartoffelsaft). Die ausscheidende gelbe Bleiproteinfällung zentrifugierten wir. Das Filtrat überschwemmten wir und suspendierten die Fällung in einer Lösung von 0,2n Natriumhydrokarbonat auf 100 ml Original-Kartoffelsaft. Nach fünf Minuten langem Rühren ließen wir durch die Suspension 2,5 Minuten lang Kohlendioxyd in Bläschen hindurchströmen. Dann zentrifugierten wir sie und setzten der Supernatante (die das P- und Q-Enzym enthält) eine 50%ige Ammoniumsulfatlösung von $p_H = 7,0$ zu, um dadurch die Konzentration der Lösung auf 18% (bezogen auf das Ammoniumsulfat) zu bringen. Die ausgeschiedene Fällung (Q-Enzym) zentrifugierten wir und stellten die Konzentration des Supernatante-Ammoniumsulfats auf 35% mit einer 50%igen Ammoniumsulfatlösung von $p_H = 7,0$ ein. Nach dem Zentrifugieren lösten wir die ausgeschiedene Fällung, die das Phosphorylase-Enzym ist, in destilliertem Wasser auf (20 ml destilliertes Wasser auf 100 ml Original-Kartoffelsaft). Die frühere Fraktionierung mit Ammoniumsulfat wiederholten wir noch zweimal. Die gereinigte Enzymfällung lösten wir in 0,01n Zitratpuffer von $p_H = 7,0$ (2 ml Puffer/100 ml Original-Kartoffelsaft) und lagerten sie in einem Kühlschrank. Die spezifische Aktivität des so gewonnenen Enzyms beträgt 34 Enzymeinheiten/mg Protein. Sämtliche Vorgänge nach dem Pressen führten wir bei 0° C durch. Den Amylasegehalt der gereinigten Kartoffel-Phosphorylase inaktivierten wir durch Wärmebehandlung. Die Enzymlösung inkubierten wir 15 Minuten lang bei 56° C. Die warmbehandelte Probe zeigte keine Amylase-Aktivität und ihre Phosphorylase-Aktivität verringerte sich auf 52%.

Die Enzymaktivität wurde von uns nach der Methode von GREEN und STUMPF [9] mit der Modifikation gemessen, daß wir die dem Reaktionsgemisch zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Proben analysierten, was uns in die Lage versetzte, aus der so erhaltenen Konversionskurve die Enzymaktivität genauer zu bestimmen. Den im Laufe der Reaktion frei gewordenen anorganischen Phosphor bestimmten wir nach der Methode von FISKE und SUBBAROW [15] kolorimetrisch. Die Einheit der Enzymaktivität ist das in 3 Minuten frei werdende 0,1 mg anorganische Phosphat bei 20° C und bei einem $p_H = 6,0$.

3.1. Synthese der Amylose mit Phosphorylase

HANES [1] publizierte als erster die Synthetisierung der Amylose. Als Starter gebrauchte er eine Stärkelösung. WHELAN und seine Mitarbeiter benützten als Starter statt der Stärke Maltooligosaccharide [5]. Der Polymerisationsgrad der nach diesen zwei Methoden dargestellten Produkte schwankt zwischen 50 und 200.

Erstmalig synthetisierte HUSEMANN Amylose von mehreren Tausend Polymerisationsgraden [14]. Er legte hierbei das zur Synthese erforderliche Glukose-1-Phosphat, Maltooligosaccharid, den Zitratpuffer, das Ammoniummolybdat, Quecksilberchlorid und die amylasefreie Phosphorylase in ein aus dialysierenden Zellen bestehendes Gefäß, welches 0,1 M Glukose-1-Phosphat und 0,2 M ($p_H = 7,0$) Zitratpuffer enthielt. Nach dieser Methode läßt sich das Gleichgewicht in Richtung der synthetischen Amylose von höherem Polymerisationsgrad verschieben, weil das frei gewordene anorganische Phosphat durch die dialysierende Folie hindurch nach außen, das Glukose-1-Phosphat hingegen durch die dialysierende Folie einwärts diffundiert. Nach der Mitteilung HUSEMANNs entsteht auf diese Weise nicht nur ein Produkt mit hohem Polymerisationsgrad, vielmehr erfolgt bei diesem Verfahren auch keine Retrogradation der Amylose.

Im Laufe unserer Versuche prüften wir den Verlauf der Amylosesynthese parallel in Gegenwart von Maltotriose, Maltotetraose und Maltopentaose als Starter. Die Reaktionsgemische wurden wie folgt zusammengestellt:

12 ml Glukose-1-Phosphat von 0,1 M ($p_H = 7,0$); 1 ml Zitratpuffer von 0,2 M ($p_H = 7,0$); 0,4 ml 8,3%ige Ammoniummolybdatlösung; 0,12 ml 0,015 mmoliges Quecksilberchlorid; 1 ml Enzymlösung.

Als Starter wogen wir zu den einzelnen Proben $2,48 \times 10^{-3}$ mmol Maltotriose, 3×10^{-3} mmol Maltotetraose bzw. $3,3 \times 10^{-3}$ mmol Maltopentaose ein. Die Proben wurden mit destilliertem Wasser auf 20 ml aufgefüllt. Die Reaktion spielte sich bei 20° C thermostiert ab.

Um den Reaktionsablauf zu verfolgen, nahmen wir um 1, 2, 3, 4 und 23 Uhr Proben von je 0,3 ml, die wir mit destilliertem Wasser auf 5 ml auf-

füllten. Zur Inaktivierung des Enzyms hielten wir die Proben 10 Minuten lang im heißen Wasserbad, kühlten sie danach ab und entfernten die ausgeschiedene Proteinfällung durch Zentrifugieren. Die supernatante Lösung füllten wir mit destilliertem Wasser auf 25 ml auf. Von ihr verbrauchten wir 5 ml zum Messen des frei gewordenen Phosphors, 5 ml nach Zugabe von 1 ml 0,01 n Jodlösung zum Messen der Farbintensitätszunahme des synthetischen Amylose-Jodkomplexes. Die Resultate sind in den Tabellen I und II zusammengefaßt.

Tabelle I

Zunahme des freien Phosphatgehaltes in Gegenwart verschiedener Maltooligosacchariden-Starter

Zeit der Probe- entnahme (Stunde)	Mit		
	Maltotriose	Maltotetraose	Maltopentaose
	als Starter gemessene Extinktion		
1	0,13	0,29	0,24
2	0,20	0,41	0,36
3	0,28	0,48	0,42
4	0,32	0,52	0,47
23	0,48	0,52	0,48

Tabelle II

Zunahme der Farbintensität des Amylose-Jodkomplexes in Gegenwart vom Maltooligosacchariden-Starter

Zeit der Probe- entnahme (Stunde)	Mit		
	Maltotriose	Maltotetraose	Maltopentaose
	als Starter gemessene Extinktion		
1	0,08	0,41	0,21
2	0,11	0,75	0,49
3	0,15	0,78	0,75
4	0,21	0,79	0,81
23	0,22	0,91	0,88

Zur Festsetzung des Polymerisationsgrades nahmen wir um 2, 4 und 23 Uhr aus dem Reaktionsgemisch Proben von je 4 ml. Nach Zentrifugieren der ausretrogradierten Amylose inaktivierten wir das Enzym in der Supernatante durch Erwärmen und zentrifugierten die ausgeschiedene Proteinfällung abermals. Der Supernatante setzten wir 3 Volumina 96%igen Äthylalkohol zu. Die ausgeschiedene synthetische Amylose und die retrogradierte

Amylose wuschen wir mit Alkohol, dann mit Äther und trockneten sie im Vakuum.

Den Polymerisationsgrad der Proben bestimmten wir durch Perjodatoxydation. Die Menge der entstandenen Ameisensäure wurde nach einer von uns schon früher ausgearbeiteten Mikro-Ameisensäure-Bestimmungsmethode [16] gemessen. Aus den gemessenen Ameisensäure-Mengen berechneten wir den Polymerisationsgrad der Proben. Die gewonnenen Ergebnisse sind der Tabelle III zu entnehmen.

Tabelle III

Zunahme des durchschnittlichen Polymerisationsgrades der mit verschiedenen Maltooligosacchariden-Startern synthetisierten Amylose im Laufe der Reaktion.

Proben	Durch Perjodatoxydation bestimmte durchschnittliche Polymerisationsgrade
<i>Maltotriose</i>	
aus 2stündiger Probe	93
.. 4	143
.. 23	233
<i>Maltotetraose</i>	
aus 2stündiger Probe	182
.. 4	197
.. 23	197
<i>Maltopentaose</i>	
aus 2stündiger Probe	138
.. 4	180
.. 23	183

Amylose mit hohem Polymerisationsgrad synthetisierten wir wie folgt: In eine Epruvette wogen wir 3,6 ml Glukose-1-Phosphatlösung von 0,1 M und 0,3 ml Zitratpuffer von 0,2 M ($p_H = 7,0$), in den dialysierenden Sack hingegen 1,2 ml Glukose-1-Phosphat von 0,1 M, 0,25 ml in Wasser gelöste 3×10^{-4} mmolige Maltotetraoselösung, 1 ml bei 56°C amyloasefrei gemachte Phosphorylase, 0,1 ml Zitratpuffer von 0,2 M, 0,05 ml 8,3%ige Ammoniummolybdatlösung und 0,12 ml 0,0153 mmolige Quecksilberchloridlösung ein. Danach setzten wir den dialysierenden Sack in die in der Epruvette befindliche Lösung und hielten sodann das ganze 30 Stunden lang bei 20°C im Thermostat. Auch in dieser Versuchsserie bildete sich retrogradierte Amylose.

Wie oben beschrieben, präparierten wir auch hier sowohl die gelöste als auch die retrogradierte Amylose und ermittelten ihren Polymerisationsgrad

gesondert durch Perjodatoxydation. Für die retrogradierte Amylose erhielten wir einen durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 250, für die gelöste Amylose dagegen einen durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 555.

Die so gewonnenen Amyloseproben verwendeten wir dann zu Vergleichsversuchen, über deren Ergebnisse wir später berichten werden.

Zusammenfassung

Die Kartoffelphosphorylase haben wir durch Modifizierung und Kombination der Methoden von Barker, Bourne, Wilkinson und Peat sowie Husemann hergestellt. Die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms betrug 34 Enzymeinheiten/mg Protein. Mit dem nach dieser Methode gewonnenen Enzym erzeugten wir synthetische Amylose mit Polymerisationsgraden von durchschnittlich 180–230 bzw. 555. Als Starter verwendeten wir Maltotriose, Maltotetraose und Maltopentaose.

Literatur

1. HANES, C. S.: Proc. Roy. Soc., London **B123**, 421 (1940).
2. CORI, G. T.—CORI, C. F.: J. Biol. Chem., **135**, 733 (1940).
3. HIDY, P. H.—DAY, H. G.: J. Biol. Chem., **152**, 477 (1944).
4. WEIBULL, C.—TISELIUS, A.: Arkiv. Kemi. Mineral. Geol. **A.19**, 1 (1945).
5. WHELAN, W. J.—BAILEY, J. M.: Biochem. J. **58**, 560 (1954).
6. WHELAN, W. J.—ROBERTS, P. J.: Biochem. J. **58**, 569 (1954).
7. HUSEMANN, E.—PFANNEMÜLLER, B.: Makromol. Chem., **43**, 156 (1961).
8. HANES, C. S.: Proc. Roy. Soc., London **B129**, 174 (1940).
9. GREEN, D. E.—STUMPF, P. K.: J. Biol. Chem. **142**, 355 (1942).
10. HIDY, P. H.—DAY, H. G.: J. Biol. Chem., **160**, 273 (1945).
11. BARKER, S. A.—BOURNE, E. J.—WILKINSON, E. A.—PEAT, S.: J. Chem. Soc. **1949**, 1507.
12. BAUM, H.—GILBERT, G. A.: Nature, **171**, 983 (1953).
13. LEE, Y. P.: Biochim. et Biophys. Acta **43**, 18 (1960).
14. HUSEMANN, E.—FRITZ, B.—LIPPERT, R.—PFANNEMÜLLER, B.: Makromol. Chem. **26**, 199 (1958).
15. FISKE, C. H.—SUBBAROW, L. S.: J. Biol. Chem. **66**, 375 (1925).
16. HOLLÓ, J.—LÁSZLÓ, E.—GANTNER, GY.—HOSCHKE, Á.—SZEJTLI, J.: Die Nahrung **7**, 33 (1963).

Prof. Dr. János HOLLÓ Dr. Elemér LÁSZLÓ Ágoston HOSCHKE	}	Budapest XI. Gellért tér 4, Ungarn
---	---	------------------------------------