

# DIE BIOSYNTHESE DER STÄRKE, II\*

## SYNTHESE DES AMYLOPEKTINS

Von

J. HOLLÓ, E. LÁSZLÓ, Á. HOSCHKE und J. GELENCSÉR

Lehrstuhl für Landwirtschaftlich Chemische Technologie,  
Technische Universität, Budapest

(Eingegangen am 23. März, 1964)

### Einleitung

Bei Untersuchung der Wirkung der ungereinigten Phosphorylase-Präparate auf das Glukose-1-Phosphat erhielten BOURNE und PEAT ein Produkt, welches sich mit Jod rotbraun färbte [1]. Aus dieser Tatsache folgerten sie, daß diese Phosphorylasen imstande sind, eine die 1,6-ige Bindung enthaltende Stärkefraktion mit abzweigender Kette aufzubauen. Die Gegenwart eines solchen »Abzweige-Faktors« — »branching factor« — wurde in Muskeln, in der Leber, im Herzen und auch in Pflanzen nachgewiesen [2]. HAWORTH und PEAT erzeugten 1944 aus Kartoffeln ein Enzym von hoher Reinheit und benannten es Q-Enzym [3]. Anfänglich hielten sie es für eine Phosphorylase-Sorte und nannten es Iso-Phosphorylase [4], nachdem sie aber ermittelt hatten, daß es auch in phosphatfreiem Medium wirksam ist, bewiesen sie, daß es sich um eine Transglukosidase-Type handelte [5].

Nach BARKER, BOURNE und PEAT zersetzt das Q-Enzym die die  $\alpha$ -1,4 Bindung enthaltenden Amyloseketten in kurze, etwa 20 gliedrige »Pseudoamylose«-Ketten, und baut aus diesen das Amylopektin auf [6]. Das Bemerkenswerte an der Wirkung dieses Enzyms besteht darin, daß es nicht imstande ist, die von ihm synthetisierten Bindungen zu zersetzen. Dies vermag nur das im Jahre 1951 entdeckte R-Enzym [7].

### Enzymdarstellungsmethoden

Das Q-Enzym wurde nach zwei grundlegenden Methoden dargestellt. Bei der einen handelt es sich um eine alkoholische, bei der anderen um eine fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat. Sämtliche in der Literatur behandelte Vorgangsmethoden sind nur Kombinationen dieser beiden Methoden. HANES [8] hat im Jahre 1944 aus Kartoffelsaft durch Fraktionieren mit Ammoniumsulfat eine Enzymfraktion dargestellt, die die Jodfärbung der Amylose

\* 52. Mitteilung des Lehrstuhls über die Untersuchung von Polysacchariden. Die Untersuchungen wurden im Rahmen der technisch-wissenschaftliche Zusammenarbeit mit dem Institut für Ernährung der Deutschen Akademie der Wissenschaften, Berlin, durchgeführt.

verringert. Er stellte fest, daß die Fraktion keine Amylase ist, weil das Molekulargewicht der gewonnenen Produkte nicht sank, sondern zunahm.

Nach der Methode von GILBERT und PATRICK wurden die abgeschälten und zerschnittenen Kartoffeln mit Natriumdithionitlösung behandelt, dann nach Waschen und Verbreien bei einer Alkoholkonzentration zwischen 11 bis 16% und bei  $-2^{\circ}$  C fraktioniert. Schließlich wurden sie mit Ammoniumsulfat bei 3,8 Ionenstärke und bei  $0^{\circ}$  C gefällt. Die Fällung wurde in Wasser gelöst und bis zu der bei  $10^{\circ}$  C beginnenden Trübung Ammoniumsulfat zugesetzt. Auf  $0^{\circ}$  C abgekühlt, kristallisiert sich aus der Suspension das Q-Enzym nach 5–6 stündigem Stehen heraus.

BARKER, BOURNE und PEAT [10] haben gleichzeitig mit GILBERTS eine neue Methode ausgearbeitet, nach der sie aus dem Kartoffelsaft auch die Phosphorylase erhielten. Im wesentlichen werden bei dieser Methode die Proteine nach dem Schälen, Zerschneiden und Verbreien mit einer Bleiazetatlösung ausgefällt. Aus der Fällung extrahierten sie das Q-Enzym zusammen mit anderen Enzymen durch eine Natriumhydrokarbonatlösung, wonach sie nach dem Zentrifugieren die Q-Enzym-Fraktion aus der Supernatante mit Ammoniumsulfat ausfällten. Die Enzym-Fraktion wurde dann wieder in destilliertem Wasser gelöst und mit Ammoniumsulfat in gleicher Weise wie oben ausgefällt. Das Enzym wurde in Zitratpuffer gelagert oder lyophilisiert.

BAUM und GILBERT [11] gingen vom lyophilisierten Kartoffelsaft aus. Sie ließen das Q-Enzym aus der wäßrigen Lösung bei 11%iger Äthanolkonzentration an retrogradierter Amylose bei  $0^{\circ}$  C adsorbieren. Aus der Fällung extrahierten sie das Enzym mit einem Zitratpuffer von 0,05 M ( $p_H = 6,0$ ), worauf sie es mit Ammoniumsulfat ausfällten. Das ausgeschiedene Q-Enzym wurde in wenig Wasser gelöst und im Kühlschrank gelagert.

### Synthese des Amylopektins

Amylopektin wurde erstmalig 1949 von BARKER, BOURNE und PEAT [10] synthetisiert. Später haben NUSSENBAUM und HASSID [12] sowie BECKMANN und ROGER [13] das Verfahren modifiziert. Das Wesen der Methode besteht darin, daß sie Amylose in Natriumhydroxyd lösten und dem Gemisch nach Neutralisierung einen Azetat- oder Zitratpuffer und eine Enzymlösung zugeben. Die Inkubation führten sie bei  $20^{\circ}$  C durch. In den nach verschiedenen Zeitintervallen entnommenen Proben maßen sie die Abnahmen der Farbsintensität des Amylose-Jodkomplexes an einer Kaliumjodid-Jodlösung, die den Fortschritt der Reaktion anzeigte. Nach Ablauf der Reaktion wurde die gewonnene Fällung (bei der es sich um eine retrogradierte Amylose handelt) zentrifugiert. Die nach dem Aufkochen des Supernatans gewonnene Enzym-Proteinfällung entfernten sie durch Zentrifugieren, wonach sie das Produkt nach Dialy-

sieren mit Äthylalkohol bzw. nur die nicht reagierte Amylose mit Pentazol ausfällen. Das synthetisierte Amylopektin wurde jedoch nach dem Entfernen des Pentazols mit Äthylalkohol ausgefällt.

### Experimenteller Teil

Im Laufe unserer Versuche haben wir das Kartoffel-Q-Enzym nach der modifizierten Methode von BARKER, BOURNE und PEAT dargestellt, doch war das so hergestellte Produkt nicht entsprechend rein. Vor allem war es die Gegenwart von R-Enzym, die die weiteren Versuche störte. Die Gegenwart des R-Enzyms ließ sich daran erkennen, daß die Farbtintensität des Amylose-Jodkomplexes nach einer einstündigen Abnahme wieder zuzunehmen begann. Zur Entfernung des R-Enzyms arbeiteten wir auf Grund der Angaben von HOBSON, WHELAN und PEAT [7] sowie von GILBERT und PATRICK [9] eine Methode zur Reinigung des Q-Enzyms aus. Das Wesen des Verfahrens besteht darin, daß das R-Enzym bei einer 20%igen Äthylalkoholkonzentration noch in Lösung gehalten werden kann, obwohl doch das Q-Enzym schon bei einer 16%igen Äthylalkoholkonzentration ausfällt.

Die Enzympräparationsvorgänge haben wir vom Pressen angefangen bei 0° C durchgeführt.

Die Kartoffeln hielten wir nach dem Schälen und Zerschneiden (zur Hemmung der Phenoloxydase) 20 Minuten lang unter einer 0,5%igen Natriumditionitlösung. Nach dem Waschen, Verbreien und Pressen zentrifugierten wir die Lösung, stellten wir das  $p_H$  des Supernatans mit 0,02 n Natriumhydroxyd auf 7,2 ein und setzten schließlich 30 ml Bleiazetatlösung zu 100 ml Kartoffelbrühe zu. Die gelbe Bleiproteinfällung zentrifugierten wir, während die Supernatante ausgegossen wurde. Die Fällung behandelten wir 5 Minuten lang mit einer Lösung von 0,2 M/10 ml Natriumhydrokarbonatlösung in 100 ml Original-Kartoffelsaft; danach leiteten wir 2,5 Minuten lang Kohlendioxyd durch die Suspension, zentrifugierten diese und gaben dann zur Supernatante eine Ammoniumsulfatlösung mit einer Konzentration von 50 g/100 ml ( $p_H = 7,0$ ) dazu, so daß die Konzentration der Lösung von Ammoniumsulfat einen Wert von 19 g/100 ml erreichte. Die ausgeschiedene Fällung (Q-Enzymfraktion) lösten wir in destilliertem Wasser (20 ml dest. Wasser/100 ml Original-Kartoffelsaft) und gaben dann wiederholt soviel besättigte Ammoniumsulfatlösung zu, daß sich die Lösung auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 18 g/100 ml stellte. Die Fällung (Q-Enzym) zentrifugierten wir und reinigten sie von R-Enzym auf folgende Weise: die gewonnene Q-Enzymfällung lösten wir in einem Natriumzitatpuffer von 0,01 Ionenstärke bei  $-2^\circ\text{C}$  ( $p_H = 6,0$ ). Die Lösung stellten wir zuerst auf eine 11%ige Äthylalkoholkonzentration ein, und zentrifugierten dann die ausgeschiedene Fällung. Die im Wasser schwer lösliche Fällung zeigt keine Enzymaktivität. Nachdem

wir die Äthylalkoholkonzentration der Supernatante auf 20% erhöht hatten, zentrifugierten wir das ausgeschiedene Material, und maßen dann die Aktivität des in 500 ml destilliertem Wasser aufgelösten Enzyms. Sie betrug 4 Enzymeinheiten/5 ml Lösung. Die weiteren Untersuchungen zeigten, daß das auf diese Weise gereinigte Kartoffel-Q-Enzym kein R-Enzym enthielt.

### Messung der Enzymaktivität

An der Abnahme der Farbe des Amylose-Jodkomplexes kann die Reaktionsgeschwindigkeit gemessen werden. Die Untersuchung führten wir mit einem Pulfrich-Photometer durch. Zur Untersuchung verwendeten wir einen Amylose-Butanol-Komplex, aus welchem wir das Butanol durch Sieden entfernten. Mit Zumessung stellten wir eine Lösung von 2 mg/ml Konzentration her. Von dieser Amylose-Lösung gebrauchten wir zur Messung der Aktivität 5 ml und von der Enzymlösung ebenfalls 5 ml. Als Kontrollprobe gebrauchten wir 5 ml Amyloselösung und 5 ml destilliertes Wasser. Das Reaktionsgemisch setzten wir in ein Wasserbad von 20° C, und entnahmen ihm in 0,15, 30, 60 und 120 Minuten Proben von je 1 ml. Die herausgenommenen Proben legten wir vor dem Photometrieren 10 Minuten lang in siedendes Wasser, um das Enzym zu inaktivieren. Nach Zentrifugieren des ausgeschiedenen Enzymproteins gossen wir die Supernatante in einen 100 ml Normalkolben, und stellten das  $p_H$  der Lösung mit 0,01 n Salzsäure auf 5,0 ein, dann gaben wir 1 ml Jodlösung (5 g  $J_2$  + 7,5 g KJ/100 ml dest. Wasser) dazu und füllten mit destilliertem Wasser bis zum Zeichen auf. Die Farbintensität der Lösung maßen wir auf dem Pulfrich-Photometer mit dem Filter S-66. Die Aktivitätseinheit des Q-Enzyms ist jene Enzymmenge, die die Farbintensität des Amylose-Jodkomplexes unter den obigen Umständen in 1 Minute um 1% verringert [14].

### Synthetisierung von Amylopektin

Zur Synthese gebrauchten wir einen Amylose-Butanol-Komplex, der einer Amylosemenge von 1,5 g entspricht. Nach Entfernen des Butanols füllten wir die Lösung auf 650 ml auf, dann gaben wir aus der Q-Enzymlösung mit der oben angegebenen Aktivität 250 ml (4 Enzymeinheiten/5 ml Enzymlösung) zu und füllten sie schließlich mit destilliertem Wasser auf 1500 ml auf. Puffer gebrauchten wir keinen, weil wir im Laufe der Voruntersuchungen erfahren hatten, daß sich das  $p_H$  des Reaktionsgemisches während der Synthese nicht ändert. Dies hat den großen Vorteil, daß die Dialyse ausbleiben kann, so daß keine Retrogradation eines Teils der Substanz erfolgt, die bei einer Dialysierung bestimmt eintreten würde.

In Intervallen von je 30 Minuten nahmen wir Proben von 1 ml, und maßen den Fortschritt der Reaktion ähnlich wie bei der Aktivitätsmessung.

Sobald der anfängliche Extinktionswert auf 80% gesunken war, nahmen wir eine Probe von 300 ml und kochten sie bis zum Sieden. Das ausgeschiedene Enzymprotein zentrifugierten wir und dampften die Supernatante bei 35° — 40° C im Vakuum auf etwa 20 ml ein. Die aus der eingedampften Lösung ausgeschiedene Fällung zentrifugierten wir und setzten der Supernatante 60 ml 96%igen Äthylalkohol zu. Das gewonnene Produkt wuschen wir mit Alkohol und trockneten es im Vakuum-Exsikkator.

### Synthese des Amylopektins aus linearen Dextrinen

Die linearen Dextrine gewannen wir durch schwefelsäurige Hydrolyse der Amylose. Der Polymerisationsgrad der drei verschiedenen Dextrinproben betrug 180, 165 und 110. Aus den Dextrinen haben wir je 0,5 g eingemessen und in 450 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach der Auflösung setzten wir aus der Q-Enzymlösung mit der oben angegebenen Aktivität 50 ml zu und nahmen 4stündlich Proben, worauf die Jodverfärbung gemessen wurde. Die Reaktion endete nach 16 Stunden. Die Probe kochten wir bis zum Sieden und zentrifugierten das ausgeschiedene Enzymprotein. Die Supernatante dampften wir bei 40° C im Vakuum auf 20 ml ein, um hierauf mit 60 ml 96%igem Alkohol das synthetisierte Produkt zu fällen. Schließlich wuschen wir es mit Alkohol und trockneten es im Vakuum-Exsikkator.

### Analyse des Produktes

Wir untersuchten die Produkte durch Perjodatoxydation [15] und prüften an den Proben, die aus der Amylose während der Synthese zu verschiedenen Zeitpunkten genommen worden waren, mit dem Spektrophotometer, welches den Fortschritt der Reaktion in Richtung des synthetisierten Amylopektins deutet.

#### 1. *Untersuchung des synthetischen Amylopektins mit dem Spektrophotometer*

Methode: In einen Achatmörser wurden 3 mg Material eingemessen und mit 96%igem Alkohol verrieben. Das ganze überwuschen wir dann mit destilliertem Wasser in eine Epruvette, wonach wir es im Wasserbad bis zum restlosen Entweichen des Alkohols und bis zur Auflösung des Produktes kochten. Nach Abkühlung wuschen wir es in einen 100 ml Normalkolben durch und setzten 1 ml Jodlösung zu und füllten es mit destilliertem Wasser bis zum Zeichen auf. Das Spektrum haben wir mit einem Spektrophotometer Type Zeiss Universal aufgenommen (Abb. 1). Wie ersichtlich, nimmt die Absorption

mit fortschreitender Reaktion ab. Auch verschiebt sich das Maximum der Kurve in Richtung der niedrigen Wellenlängen. Dies allein beweist aber nicht, daß im Laufe der Reaktion tatsächlich Amylopektin entstanden ist. Hierzu muß auch die Zunahme der Anzahl der Abzweigungen gemessen werden.

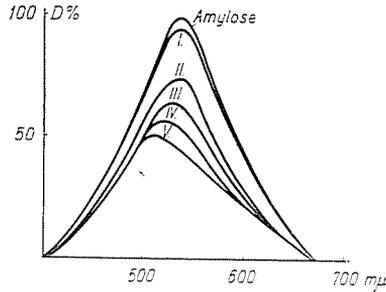


Abb. 1

## 2. Bestimmung des Polymerisationsgrades durch Perjodatoxydation

*Methode* : Aus der Messung der Menge der im Laufe der Perjodatoxydation frei gewordenen Ameisensäure kann der Polymerisationsgrad bestimmt werden. Die frei gewordene Ameisensäure wurde nach einer von uns früher ausgearbeiteten Mikroameisensäure-Bestimmungsmethode gemessen [15]. Aus

Tabelle I

Perjodatoxydation der bei der Amylopektin-Synthese aus Amylose gewonnenen Produkte

Geprüftes Material	Einmessung (mg)	Auf freie Ameisensäure entfallende Glukose-Anhydrid-Einheit	Auf gebundene Ameisensäure entfallende Glukose-Anhydrid-Einheit
Ausgangs-Amylose .....	79.0	202	197
Probe I. ....	43.1	183	172
.. II. ....	58.8	159	220
.. III. ....	38.9	127	812
.. IV. ....	46.4	40	1800
.. V. ....	79.4	34	5140

dieser Messung berechneten wir den Polymerisationsgrad. Die Perjodatoxydation führten wir auf folgende Weise durch: 50 mg Probe lösten wir in 3 ml destilliertem Wasser, worauf wir 2 ml Natriummetaperjodatlösung zusetzten (40 mg Natrium-metaperjodat/1 ml destilliertes Wasser). Die Reaktion wurde bei 2° C durchgeführt. Aus dem Reaktionsgemisch nahmen wir zeitweise Proben von je 2 ml, denen wir 1 ml Äthylenglykol zusetzten.

Im Dunkeln ließen wir sie 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen, worauf die frei gewordene Ameisensäure gemessen wurde.

Die Zahl der auf eine Abzweigung auffallenden Glukose-Einheiten berechneten wir bei Synthese des Amylopektins aus Amylose aus den während der Reaktion genommenen Proben, und ebenso bei Synthese des Amylopektins aus linearem Dextrin. Die bei der Synthese des Amylopektins aus Amylose gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengefaßt. Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß der Polymerisationsgrad des Produktes und die Zahl der nicht reduzierenden Endgruppen, d. h. die Zahl der Abzweigungen im Laufe der Reaktion zunimmt.

Die bei der Synthese aus Dextrinen gewonnenen Resultate sind zusammen mit dem Polymerisationsgrad der Ausgangs-Dextrinen in Tabelle II

Tabelle II

Perjodatoxydation der bei der Amylopektin-Synthese aus Dextrinen gewonnenen Produkte

G prüftes Material	Einmessung (mg)	Auf freie Ameisensäure entfallende Glukose-Anhydrid-Einheit	Auf gebundene Ameisensäure entfallende Glukose-Anhydrid-Einheit
Ausgangs-Dextrin .....	100,0		
Probe I. ....	100,0	180	182
.. II. ....	103,6	165	159
.. III. ....	105,2	110	92
Synthetisches Amylopektin aus Dextrin			
Probe I. ....	50,0	40	1420
.. II. ....	36,9	36	1310
.. III. ....	43,3	29	1030

zusammengefaßt. Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß der Verzweigungsgrad des natürlichen Amylopektins bei Verwendung von Dextrin mit kleinerem Polymerisationsgrad rascher erreicht werden kann.

### Zusammenfassung

Nach der modifizierten Methode von BARKER, BOURNE, PEAT erzeugten wir Kartoffel-Q-Enzym, dessen Verunreinigung durch R-Enzym nach einem von uns ausgearbeiteten Verfahren entfernt wurde. Mit diesem Enzym synthetisierten wir aus Amylose und aus linearem Dextrin mit einem Polymerisationsgrad von 180, 165 und 110 Amylopektin. Die auf diese Weise dargestellten Produkte untersuchten wir durch Jodfärbung- und durch eine Perjodatoxydationsanalyse.

## Literatur

1. BOURNE, E. J.—PEAT, S.: J. Chem. Soc., London 1945, 877.
2. BEAR, R. S.—CORI, C. F.: J. Biol. Chem., 140, 111 (1941).
3. HAWORTH, W. N.—PEAT, S.—BOURNE, E. J.: Nature 154, 236 (1944).
4. BERNFELD, P.—MEUTÉMÉDIAN, A.: Nature, 162, 297 (1948).
5. BARKER, S. A.—BOURNE, E. J.—WILKINSON, E. A.—PEAT, S.: J. Chem. Soc. 1950, 93
6. BARKER, S. A.—BOURNE, E. J.—PEAT, S.: Nature 161, 127 (1948).
7. HOBSON, P. J.—WHELAN, W. J.—PEAT, S.: J. Chem.-Soc. 1451 (1951).
8. HANES, C. S.: Nature 154, 236, 239 (1944).
9. GILBERT, G. A.—PATRICK, A. D.: Nature 164, 573 (1950).
10. BARKER, S. A.—BOURNE, E. J.—PEAT, S.: J. Chem. Soc. 1705 (1959).
11. BAUM, H.—GILBERT, G. A.: Nature 171, 983 (1953).
12. BECKMANN, C. O.—ROGER, M.: J. Biol. Chem. 190, 476 (1951).
13. NUSSENBAUM, S.—HASSID, W. Z.: J. Biol. Chem. 190, 673 (1951).
14. IGAUE, J.: J. Agr. Chem. Soc. Japan 34, 1032 (1960).
15. HOLLÓ, J.—LÁSZLÓ, E.—GANTNER, GY.—HOSCHKE, Á.—SZEJTLI, J.: Die Nahrung 7, 33 (1963).

Prof. Dr. János HOLLÓ  
Dr. Elemér LÁSZLÓ  
Ágoston HOSCHKE  
János GELENCSÉR

Budapest XI. Gellért tér 4, Ungarn