

NEUERE BEITRÄGE ZUR CHEMIE DER STÄRKEFRAKTIONEN. XIV.*

DIE BIOSYNTHESE DER MIT C^{14} UNIVERSELL MARKIERTEN KOHLEN-
HYDRATE UND DER SPEZIELL MARKIERTEN AMYLOSE-MOLEKÜLE**

Von

E. LÁSZLÓ, J. HOLLÓ, J. SZEJTLI, M. TÓTH und E. VÁNDOR

Lehrstuhl für Landwirtschaftlich-Chemische Technologie,
Technische Universität, Budapest

(Eingegangen am 21. Februar, 1963)

Die Anwendung der mit radioaktivem Kohlenstoff markierten Verbindungen zur Untersuchung chemischer und biochemischer Reaktionsmechanismen hat bereits weite Verbreitung gefunden. Eine der Ursachen hierfür liegt darin, daß die mit C^{14} markierten Moleküle leicht detektierbar sind und so von den inaktiven leicht unterschieden werden können. Besondere Bedeutung kommt diesem Umstand in der Untersuchung der verschiedenen Reaktionsmechanismen der aus mehreren tausend identischen Grundeinheiten aufgebauten polymeren Moleküle zu.

Wir befassen uns seit längerer Zeit mit der genauen Aufklärung der verschiedenen Eigenschaften und Reaktionsmechanismen der Stärke. Im Laufe unserer Forschungsarbeit tauchten mehrere Probleme auf, deren Lösung nur mit Hilfe markierter Verbindungen zu erhoffen ist.

Die bisher dargestellten Verbindungen werden in folgender Gruppierung behandelt:

1. Herstellung universal markierter Glukose, Fruktose und Saccharose.
2. Herstellung mit C^{14} markierter Stärke.
3. Herstellung mit C^{14} universal markierten Glukose-1-Phosphats und aus diesem Glukose-6-Phosphats.
4. Herstellung von Maltose, Maltotriose, Maltotetraose und Maltopentaose.
5. Synthese der an ihrem reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Ende markierten Amylose sowohl aus markiertem Glukose-1-Phosphat wie auch aus markierten Maltooligosacchariden sowie aus inaktivem Dextrin und inaktivem Glukose-1-Phosphat.

* Der XIII. Teil erschien in: Die Nahrung 7, 33 (1963).

** 44. Mitteilung über die Polysaccharidforschung des Lehrstuhles. Ausgearbeitet im Rahmen der mit der Deutschen Akademie der Wissenschaften, Berlin, eingegangenen technisch-wissenschaftlichen Kooperation.

1. Zur Biosynthese der Glukose, Fruktose und Saccharose

verwendeten wir die Blätter der *Canna indica*, die das, aus Bariumcarbonat frei gemachte aktive Kohlendioxyd assimilierte. (Die Einzelheiten der Photosynthese siehe unten.) Nach der Photosynthese wurden die Blätter in heißem Alkohol abgetötet, der Alkohol wurde im Vakuum abdestilliert. Nach Behandlung mit Aktivkohle wurde das Gemisch papierchromatographiert (Lösungsmittel Butanol:Etanol:Wasser —52,2:32:15,5). Nach dieser Methode gewannen wir aus einem ca. 10 g wiegenden Blatt der *Canna indica* 70 mg Glukose (spez. Aktivität 1,5 mC/mMol), 70 mg Saccharose (spez. Aktivität 4,1 mC/mMol) und 60 mg Fruktose (spez. Aktivität 1,7 mC/mMol).

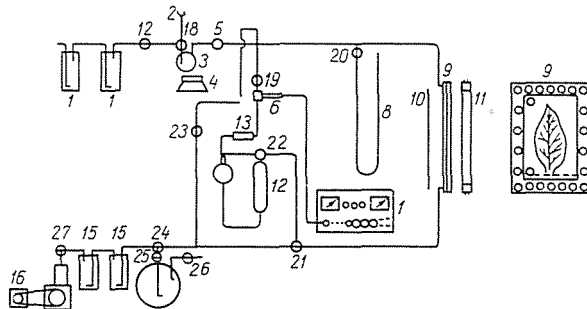


Abb. 1. Die Assimilationseinrichtung, 1 = Mit Natronlauge gefüllter Gaswäscher, 2 = Tropftrichter, 3 = Zweihalskolben mit Schläffen, 4 = Magnetrührwerk, 5 = Sinterglas-Filtereinsatz, 6 = Geiger-Müller-Zählrohr mit kleiner Gaskammer (mit einer 1,8 mg/cm²-Endscheibe aus Mika), 7 = Ratemeter, 8 = Quecksilber-Manometer, 9 = Assimilationskammer, 10 = Spiegel, 11 = Leuchtröhre, 12 = Quecksilbergas-Umlaufeinrichtung, 13 = Gastrockner, mit CaCl₂ gefüllt, 14 = Vakuumreserve, 15 = mit Natronlauge gefüllter Gaswäscher, 16 = Vakuumpumpe, 17—19—20—23—25—26 = Einweghähne, 18—21—24—27 = Dreiweghähne, 22 = Zweiweghahn

2. Zur Herstellung mit C¹⁴ universal markierter Stärke

verwendeten wir Tabakblätter und aktives Kohlendioxyd [1, 2, 3, 8]. Nach 24stündigem Nährstoffentzug legten wir die 15—20 cm langen Blätter in die mit 9 bezeichnete Assimilationskammer des in Abb. 1 gezeigten Apparates. Die Kammer ist aus Plexiglas und hat eine Gummiplattendichtung und einen Rahmen aus rostfreiem Stahl. Wir stellten die Apparatur unter Vakuum und machten aus Bariumcarbonat [3], durch Zugabe von Milchsäure [2], Kohlendioxyd frei. Dann setzten wir die Blätter für 24 Stunden lang der Lichteinwirkung aus, während dieser Zeit verbrauchten sie den größten Teil des Kohlendioxyds. Nach der Kontrolle (mittels eines eingebauten GM-Zählrohres [6]) absorbierten wir das zurückgebliebene aktive Kohlendioxyd in einer mit Alkali beschickten Waschflasche [14]. Nach Zerlegen der Apparatur wurden

die Blätter in 80%igem heißem Alkohol abgetötet und schließlich die Stärke mit kalter Perchlorsäure extrahiert.

Auf diese Weise stellten wir aus einem ca. 10 g wiegenden Tabakblatte 132 mg Tabakstärke mit 0,95 mC/mMol spez. Aktivität her.

3. Herstellung mit C^{14} markierten Glykose-1-Phosphats

Nach den in der Literatur angeführten Methoden [4, 5, 6, 7] kann mit Pflanzenphosphorylasen aus Stärke und anorganischem Phosphat Glykose-1-Phosphat im Makro-Maßstab mit einer Ausbeute von 30–40% hergestellt

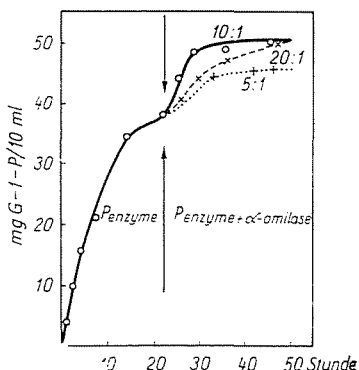


Abb. 2. Bildung von Glukose-1-Phosphat durch Mischungen von Phosphorylase und α -Amylase in verschiedenem Mischungsverhältnis

werden. Diese Ausbeute würde sich — da es sich um eine Mikromethode handelt — bei der Herstellung mit C^{14} markierten Glukose-1-Phosphats noch weiter vermindern.

Da schon die von Anfang an verwendbare Menge der radioaktiven Stärke gering ist, mußte der Glukose-1-Phosphat-Ertrag erhöht werden.

Eines der Mittel, die Ausbeute zu erhöhen, besteht darin, die weitere Phosphorylierung des nach der ursprünglichen Phosphorylierung zurückbleibenden sogenannten »Phosphorylase-Grenzdextrins« zu ermöglichen. Das Problem kann mit Hilfe einer in entsprechender Menge dosierten Alpha-Amylase gelöst werden. Die Phosphorylase ist nämlich ähnlich der Beta-Amylase nicht imstande, die Abzweigungspunkte der Amylopektinmoleküle zu umgehen. Spaltet man das auf dieser Weise sich ausbildende sogenannte »Grenzdextrin« mit Alpha-Amylase in kleinere Stücke — die Alpha-Amylase kann die Abzweigungspunkte umgehen —, dann werden für die Phosphorylase weitere Bindungen zugänglich. In Abb. 2 ist das Ergebnis eines solchen Versuchs dargestellt. Anfangs wirkte nur die Phosphorylase, später, nachdem sich das Gleichgewicht eingestellt hatte, das in entsprechendem Verhältnis (5 : 1, 10 : 1, 20 : 1) angewandte Gemisch der Phosphorylase und Alpha-

Amylase auf die Stärke ein. Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß sich die weitgehendste und optimal beschleunigte Phosphorylierung bei einem Gemisch im Verhältnis von 10 : 1 erreichen läßt [8].

Nach dieser Methode konnten wir aus 40 mg Tabakstärke von 0,9 mC/mMol spez. Aktivität, 50 mg Glukose-1-Phosphat ähnlicher spez. Aktivität gewinnen. Das Glukose-1-Phosphat isolierten wir auf papierchromatographischem Wege.

(Lösungsmittel: Monochloressigsäure [25%ig]: Aceton = 4 : 1.)

Das so gewonnene Glukose-1-Phosphat konvertierten wir mit dem nach der Methode von NAJJAR [3] aus Kaninchenmuskulatur präparierten Phosphoglukomutase Enzym zu Glukose-6-Phosphat mit einem Wirkungsgrad von 95,5%.

4. Herstellung von Glukose, Maltose, Maltotriose, Maltotetrose und Maltopentose

Das bei der Herstellung des Glukose-1-Phosphats zurückgebliebene, zum Teil zersetzte »Phosphorylase-Grenzdextrin« unterzogen wir einer weiteren Hydrolyse mit Salzsäure und isolierten sodann aus dem Hydrolysat mit der sogenannten »wiederholten Papierchromatographie« die oben erwähnten Maltoligosaccharide. Die Hydrolyse führten wir bei 100° C mit 0,1 N Salzsäure 60 Minuten lang, die Papierchromatographie mit Butanol : Pyridin : Wasser = 6 : 4 : 3 durch.

Nach dieser Methode kann die Tabakstärke fast zur Gänze in Glukose-1-Phosphat bzw. in Maltoligosaccharide umgewandelt werden.

5. Die Herstellung von Amylose mit 5 markierten Glukosemolekülen an ihrem reduzierenden Ende

Dazu verwendeten wir die nach der seeben beschriebenen Methode hergestellte Maltopentose. Der Maltopentose setzten wir inaktives Glukose-1-Phosphat und P-Enzym zu. Das P-Enzym gewannen wir aus Kartoffelsaft, durch Fraktionierung mit Bleiacetat und Ammoniumsulfat [10].

Die Inkubation des Reaktionsgemisches führten wir bei Raumtemperatur durch. (Über die Einzelheiten der Synthese berichten wir in einer anderen Abhandlung [11].) Den Gang der Synthese verfolgten wir durch die Bestimmung des freigewordenen anorganischen Phosphats. Am Ende der Reaktion gewannen wir eine Amylose mit einem Polymerisationsgrad von 48, in der am reduzierenden Ende 5 Glukoseeinheiten mit C¹⁴ markiert waren. (Die Ermittlung siehe weiter unten.) Zur Bestimmung des Polymerisationsgrades entwickelten wir eine Methode zur Mikro-Perjodat-Oxydation, bei der wir die sich bildende Ameisensäure in Form von Ferrihydroxamsäure photometrisch bestimmten.

6. Die Amylose mit durchschnittlich 5,3 markierten Glukoseeinheiten an ihrem nicht reduzierenden Ende

stellten wir aus linearem Dextrin mit einem Polymerisationsgrad von 43 und aus aktivem Glukose-1-Phosphat her. Das inaktive Dextrin und das aktive Glukose-1-Phosphat wurde in Gegenwart von P-Enzym zur Reaktion gebracht und indessen das frei werdende anorganische Phosphat quantitativ bestimmt. Als der berechnete Einbau einen Wert von etwa 5 ergab, wurde die Reaktion unterbrochen und die Amylose herauspräpariert. Bei der Bestimmung der Lage der Glukoseeinheiten gingen wir sowohl in diesem wie auch im vorangegangenen Fall von folgenden Erwägungen aus [13].

Ist der gegenwärtig akzeptierte Mechanismus der Amylosesynthese richtig, dann enthalten die beiden oben angeführten Proben an ihrem reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Ende tatsächlich 5 bzw. 5,3 markierte Glukosemoleküle. Erheben wir dagegen zu dieser Auslegung der Mechanismen Vorbehalte, müssen wir unsere oben angeführten Feststellungen beweisen. Im ersten Augenblick scheint diese Beweisführung ganz einfach zu sein. Wenn wir die an ihrem reduzierenden Ende markierte Amylose mit Lauge, die an ihrem nicht reduzierenden Ende markierte hingegen mit Beta-Amylose zersetzen, müssen sich die aktiven Mischungen im Anfangsstadium der Reaktion unter den Hydrolyseprodukten befinden. Wie unsere Versuche zeigten; ist dem aber nicht so, weil die Kette bei der alkalischen Hydrolyse auch in der Mitte gesprengt werden kann. Bei der Beta-Amylolyse kann hingegen der sogenannte »Einkettenmechanismus« in Erscheinung treten, wobei der Enzym-Substrat-Komplex nicht dissoziiert, solange das ganze Substratmolekül vom Enzym nicht abgebaut wurde. Zur Bestimmung des Markierungsortes ist also keine der Methoden geeignet, weshalb wir zu diesem Zwecke neue Methoden ausgearbeitet haben.

Den Markierungsort der an ihrem reduzierenden Ende markierten Amylose bestimmen wir durch Bildung von Phenylflavasol. Zu diesem Zweck wird die Amylose mit o-Phenylendiamin zur Reaktion gebracht, worauf man durch Kopplung des entstandenen Chinoxalinderivats mit Phenylhydrazin Amylose-1-Phenylflavasol erhält.

Hydrolysiert man dieses Produkt mit Säure, findet sich die reduzierende Glukoseeinheit im Phenylflavasol. Nach der papierchromatographischen Trennung ergibt sich aus dem Quotienten der Phenylflavasol- und der Glukoseaktivität, daß am reduzierenden Ende des Amylosemoleküls 5 Glukoseeinheiten markiert sind [13].

Zur Bestimmung des Markierungsortes der an ihrem nicht reduzierenden Ende markierten Amylose entwickelten wir ein Mikromethylierungsverfahren, nach welchem wir die Probe mit Dimethylsulfat in alkalischem Medium methylierten. Die gewonnene Methylamylose wurde mit methanolischer Salzsäure

hydrolysiert, die glykosidische Methylgruppe hingegen mit wässriger Salzsäure abgespalten. Aus dem so gewonnenen Gemisch isolierten wir die 2, 3, 4, 6-Tetramethylglukose, die aus der nicht reduzierenden Glukoseeinheit der Amylose entstanden war, und die aus den Kettenglukoseeinheiten entstandene 2, 3, 6-Trimethylglukose auf papierchromatographischem Wege. (Lösungsmittel N-Butanol : Etanol : Wasser : Ammoniak— 40 : 10 : 49 : 1.) Aus dem Quotienten der Aktivität der beiden Produkte konnten wir feststellen, daß die Amyloseproben an den Enden der nicht reduzierenden Ketten im Durchschnitt 5,3 markierte Glukosemoleküle enthalten.

Die auf diese Weise hergestellten zwei Amyloseproben verwendeten wir zur Untersuchung der sauren, enzymatischen und alkalischen Hydrolysemechanismen, worüber wir in einer folgenden Abhandlung berichten werden.

Zusammenfassung

Verfasser berichten über die Herstellung durch C^{14} universal markierter Glukose, Fruktose, Saccharose und Stärke mittels Photosynthese. Aus der Stärke wurden durch enzymatischen beziehungsweise sauren Abbau Glukose-1-Phosphat, Glukose-6-Phosphat, Maltose, Maltotriose, Maltotetrose und Maltopentose hergestellt. Somit wurde die Synthese der am reduzierenden beziehungsweise am nicht reduzierenden Ende markierten Amylose aus markiertem Glukose-1-Phosphat und inaktivem Dextrin sowie aus markierten Maltooligosacchariden und inaktivem Glukose-1-Phosphat verwirklicht.

Literatur

1. PUTMANN, E. W.—HASSID, W. Z.—KROTKOW, G.—, BAKER, H. A.: J. Biol. Chem. **173**, 785 (1948).
2. PORTER, H. K.—MARTIN, R. V.: J. Exp. Botany **3**, 332 (1952).
3. PORTER, H. K.—MARTIN, R. V.—BIRD, J. F.: J. Exp. Botany **10**, 264 (1959).
4. HANES, C. S.: Proc. Roy. Soc. (London) **B 128**, 421 (1939—40).
5. SUMNER, J. B.—SOMERS, G. E.: Arch. Biochem. **4**, 11 (1944).
6. BERNFELD, P. et al.: Helv. Chim. Acta **27**, 843 (1944).
7. MCCREADY, R. M.—HASSID, W. Z.: J. Am. Chem. Soc. **66**, 560 (1944).
8. HOLLÓ, J.—SZEJTLI, J.—LÁSZLÓ, E.—VÁNDOR, E.: Ind. Agr. Aliment **79**, 103 (1962).
9. NAJJAR, V. A.: J. Biol. Chem. **175**, 281 (1948).
10. BARKER, S. A.—BOURNE, E. I.—WILKINSON, I. A.—PEAT, S.: J. Chem. Soc., **1949**, 1507.
11. HOLLÓ, J.—LÁSZLÓ, E.—HOSCHKE, A.—SZEJTLI, J.: Periodica Polytechnica (chem.) 1963. (In Druck.)
12. HOLLÓ, J.—LÁSZLÓ, E.—GANTNER, G. S.—HOSCHKE, A.—SZEJTLI, J.: Nahrung **7**, 33 (1963).
13. LÁSZLÓ, E.: Dissertation, Lehrstuhl für Landwirtschaftlich-Chemische Technologie, Technische Universität, Budapest.

Prof. Dr. J. HOLLÓ Dr. E. LÁSZLÓ Dr. J. SZEJTLI M. TÓTH E. VÁNDOR, Budapest XIV. Telepes utca 53.	}	Budapest XI. Gellért tér 4, Ungarn
---	---	------------------------------------