Abbau von Kartoffelstärke durch α -Amylasen aus Malz und aus *Bacillus subtilis*. Differenzierung der Abbauprodukte

JAKOB BLOM, TORKIL SCHMITH und BIRGIT SCHWARZ

Laboratorium der Tuborg-Brauereien, Kopenhagen, Dänemark

Im Jahre 1937 zeigten Blom, Bak und Braae¹, dass absolut β -freie α -Amylase aus Malz und α -Amylase aus *Bacillus subtilis* Kartoffelstärkekleister in derselben Weise angreifen. Der Kleister wird dünnflüssig; das Vermögen, mit Jod Farbenreaktion zu geben, verschwindet bei ca. 32 % TM. Von Anfang an werden reduzierende Spaltprodukte gebildet. Ohne Rücksicht darauf, ob Mono-, Di-, Tri- oder höhere Oligosaccharide gebildet werden, wird das Reduktionsvermögen als Maltose berechnet, da dieser Zucker beim enzymatischen Stärkeabbau eine zentrale Stellung einnimmt. Der Grad des enzymatischen Stärkeabbaus wird in Prozenten der Menge Maltose angegeben, die gebildet werden würde, falls Stärke sich vollständig zu Maltose abbauen liesse. Prozent der theoretisch möglichen Menge Maltose verkürzen wir mit % TM und deuten durch Anhängen von W, B bzw. BR an, dass die Bestimmung nach Willstätters, Bertrands bzw. Blom-Rosteds Kaliumkupferkarbonat² Methode ausgeführt ist. Das Reduktionsvermögen ist ein Ausdruck für die Anzahl reduzierender Bruchstücke und gibt keine Aussage über deren Kettenlänge.

Beim Stärkeabbau durch α -Amylasen aus Malz und aus *B. subtilis* wächst das Reduktionsvermögen schnell bis ca. 40 % TM. Der Abbau geht mit ständig abnehmender Geschwindigkeit weiter. Bei Anwendung grosser Enzymmengen und langer Reaktionszeit lässt sich der Abbau auf 90—95 % TM treiben³ (Tabelle 1).

Es ist bisher noch nicht gelungen, die durch α -Amylase gebildeten Stärkeabbauprodukte präparativ zu trennen. Es werden Mono-, Di-, Tri- und Oligosaccharide (Dextrine) gebildet. Glucose, Maltose und Maltotriose sind durch *Saccharomyces carlsbergensis* vergärbar. *Saccharomyces uvarum* vergärt Glucose und Maltose; *Zygosaccharomyces Marxianus* vergärt nur Glucose⁴. Dex-

Tabelle 1. Abbau von Kartoffelstärke durch α -Amylasen.

Kleister 2,00 %, pH = 5,0, t = 20,0°
 Reduktionsvermögen, ber. als Maltose.

Zeit	Malz (1940) % TMW. Färbung mit Jod			Subtilis (1950) % TMBR
	1 Teil Enzym	2 Teile Enzym	3 Teile Enzym	
½ Std.	6,5 blau	11,2 blau	16,9 dunkelbraun	41,7
¾		16,3 dunkelbraun	22,3 rotbraun	
1	11,8 blau	21,0 rotbraun	27,3 rot	
1 ½	16,8 dunkelbraun	27,5 rot	32,3 farblos	54,1
2	20,4 braun	31,3 rot	34,8	
3	27,0 braun	35,2 farblos	37,8	
4	30,7 braun	37,5	40,0	60,7
5	33,4 farblos	39,2	41,8	
6	34,9	40,4	43,4	
1 Tag	46,1	53,8	57,6	75,7
2	52,8	61,2		80,8
3	55,7		70,6	85,8
4		68,3		
5	60,1		76,4	
6		71,9		89,0
7	62,2		78,0	
9	64,6	74,1		
11				91,3
18				95,2

trine werden von keinem der genannten Organismen angegriffen. In der vorliegenden Arbeit sind die Gärungen mit einer Ausnahme mit *S. carlsbergensis* durchgeführt.

Alle unsere Versuche sind mit Kartoffelstärke ausgeführt. Einzelheiten sind im Abschnitt »Methodik« gesammelt. Kartoffelstärkekleister wird durch α -Amylase abgebaut; die Enzymwirkung wird bei verschiedenen Abbaugraden durch Kochen sistiert. Das Reduktionsvermögen sowie die Trockensubstanz wird vor und nach der Gärung bestimmt. Die Resultate solcher Versuchsreihen sind in Tabelle 2 und 3 zusammengestellt.

Absolut β -freie α -Malz Amylase und α -Subtilis Amylase spalten von Anfang an sowohl vergärbare als unvergärbare Saccharide ab. Die Anzahl unvergärbbarer reduzierender Dextrine erreicht einen maximalen Wert nach einem Stärkeabbau von 35—40 % TM. Das Maximum ist breit. Erst nach Erreichung

Tabelle 2. Abbau von Kartoffelstärke durch α -Malzamylase. (1940). Differenzierung der Abbauprodukte durch Gärung mit *S. carlsbergensis*.

Kleister 2,00 %, pH = 4,8, t = 20,0°

Reduktionsvermögen, ber. als Maltose			Vergoren	
Vor Gärung		Nach Gärung % TMB	Scheinbare Maltose %	Trocken- substanz %
% TMW	% TMB			
10,3	8,3	6,2	2,1	1,3
13,0	9,7	7,5	2,2	1,7
—	14,9	12,5	2,4	2,3
20,9	17,7	12,8	4,9	4,0
29,0	26,0	17,9	8,1	7,4
30,3	27,8	19,2	8,6	10,1
—	30,6	19,8	10,8	10,1
36,1	33,3	20,5	12,8	13,0
38,5	35,5	21,4	14,1	15,8
40,3	38,0	21,6	16,4	16,5
46,5	44,1	21,8	22,3	22,4

eines Abbaus, der grösser als ca. 60 % TM ist, nimmt die Anzahl reduzierender Dextrine ab. Der maximale Wert von ca. 21 % TM ist derselbe für beide Amylasen.

Beim Stärkeabbau durch α -Subtilisamylase erreichten Blom, Braae und Bak⁵ im Jahre 1938 dasselbe Maximum. Zum gleichen Resultat kam 3 Jahre später Smits van Waesberghe⁴ (Tabelle 4). Bemerkenswert ist, dass man mit Pankreasamylase in demselben Abbauintervall von 40—60 % TM gleichfalls ein Maximum unvergärbaren Dextrine hat. Der maximale Wert ist jedoch nur halb so gross, 10,3 % TM⁶.

In Tabelle 2 sind die Differenzen des Reduktionsvermögens und der Trockensubstanz vor und nach der Gärung zusammengestellt. Aus dieser Versuchsreihe geht hervor, dass die vergärbaren Saccharide aus Disaccharid und/oder molaren Mengen Mono- und Trisaccharid bestehen. Bei höheren Abbaugraden wird Monosaccharid in grösseren Mengen gebildet; es kann sich hier nur um Glucose handeln⁷⁻⁹. Bei Vergärung mit *Z. Marxianus* zeigte Smits van Waesberghe, dass von 33 % TM ab Glucose in zunehmender Menge gebildet wird; bei ca. 80 % TM sind ca. 17 % der Stärke als Glucose vorhanden. Smits van Waesberghe machte es ausserdem wahrscheinlich, dass neben Glucose und Maltose vergärbare reduzierende Trisaccharide gebildet werden. In

Tabelle 3. Abbau von Kartoffelstärke durch α -Subtilisamylase. (1940). Differenzierung der Abbauprodukte durch Gärung mit *S. carlsbergensis*.

Kleister 2,00 %, pH = 4,6, $t = 25,0^\circ$.

Reduktionsvermögen, ber. als Maltose			Vergoren	
Vor Gärung		Nach Gärung	Scheinbare Maltose	Trocken-
% TMW	% TMB	% TMB	%	substanz
				%
4,9	3,5	3,3	0,2	
8,0	5,9	5,6	0,3	
12,2	10,4	8,6	1,8	
16,3	14,0	10,9	3,1	
21,5	19,3	14,9	4,4	
27,4	25,5	17,4	8,1	
31,2	29,6	19,2	10,4	
33,5	31,7	20,0	11,7	
36,5	34,3	19,9	14,4	
39,3	37,2	20,6	16,6	
41,7	40,0	21,3	18,7	
44,5	42,8	21,2	21,6	
46,7	45,0	21,5	23,5	
53,3	52,0	20,5	31,5	
*) 63,6	63,4	20,0	43,4	35,1
*) 69,9	68,5	18,7	49,8	42,0
*) 77,4	76,8	16,8	60,0	51,5
*) 82,0	81,6	16,6	65,0	54,9
*) 85,2	85,1	15,5	69,6	58,2

*) Abbautemperatur = $50,0^\circ$

unseren Versuchen mit Pankreasamylase haben wir¹⁰ gezeigt, dass diese Amylase wesentlich grössere Mengen von Trisaccharid bildet als α -Amylase aus Malz und *B. subtilis*. Auf diesem Wege ist es uns gelungen, Trisaccharid präparativ herzustellen.

Zur weiteren Charakterisierung der unvergärbaren reduzierenden Dextrine haben wir nach Sistierung der α -Amylase den Abbau mit β -Gerstenamylase fortgesetzt. Die Versuche sind auf verschiedene Weise durchgeführt. In den Versuchen mit α -Malzamylase — im Jahre 1940 ausgeführt — wurde die β -Amylase zu den unvergorenen Abbauprodukten zugegeben (Tabelle 5). In den Versuchen mit α -Subtilisamylase — im Jahre 1950 ausgeführt — wurde die β -Amylase erst nach Vergärung zugesetzt (Tabelle 6). In beiden Fällen ist das Reduktionsvermögen nach Einwirkung der Enzyme vor und nach der

Tabelle 4. Auszug aus Tabellen von Smits van Waesberghe. Abbau von Kartoffelstärke durch α -Subtilisamylase. (1941). Differenzierung der Abbauprodukte durch Gärung.

Kleister 5 %, pH = 6,3.

Tabelle Nr.	Temperatur während Abbau °C	Reduktionsvermögen, ber. als Maltose		Scheinbare Maltose vergoren %	Wirkliche Glucose %	Wirkliche Maltose %
		Vor Gärung % TM	Nach Gärung <i>S. cerevisiae</i> % TM			
42	37	20,5	14,7	5,8	Spur	
45	55	23,2	16,1	7,1	0,4	
45	55	31,0	17,8	13,2	0,5	
42	37	32,4	20,1	12,3	0,2	
43	37	36,5	20,1	16,5	1,6	
57	37	37,0	21,1	15,9	1,6	10,1
43	37	39,9	20,4	19,5	2,4	
57	37	40,7	21,6	19,1	2,6	10,9
45	55	45,6	20,2	25,4	4,2	
42	37	45,8	21,1	24,7	3,6	
57	37	48,9	22,5	26,4	4,6	14,2
43	37	52,4	20,0	32,4	5,6	
40	55	61,3	21,1	40,2	8,3	
40	55	67,6	19,1	48,5	10,6	
40	55	82,1	13,3	68,8	16,9	

Gärung bestimmt. In der letzten Versuchsreihe erreicht man einen höheren Abbau der Stärke, einerseits auf Grund der höheren Reaktionstemperatur, andererseits auf Grund der Entfernung von Reaktionsprodukten, welche den weiteren Abbau der Stärke verlangsamen. β -Amylase vergrößert das Reduktionsvermögen, indem der grösste Teil der unvergärbaren Dextrine zu vergärbaren Spaltprodukten abgebaut wird. Das Reduktionsvermögen der Dextrine, die β -Amylase anzugreifen vermag, beträgt maximal 18 % TM der ursprünglichen Stärke. Dieses Maximum erreicht man bei einem Stärkeabbau mit α -Malzamyase von ca. 35 % TM, mit α -Subtilisamylase von weniger als 42 % TM. Mit anderen Worten bildet α -Amylase unvergärbare Bruchstücke in einer Anzahl von 21 % TM; von den 21 Bruchstücken werden 18 von β -Amylase in vergärbare Spaltprodukte überführt.

Der Quotient — Zunahme des Reduktionsvermögens bei der Einwirkung von β und des Reduktionsvermögens der durch β spaltbaren Bruchstücke — gibt die durchschnittliche Anzahl von Bindungen pro Bruchstück, welche β -Amylase spaltet. Diese Anzahl ist grösser als zwei bei Abbaugraden der Stärke unter 45 % TM, gleich zwei bei weitergehendem Stärkeabbau.

Tabelle 5. Abbau von Kartoffelstärke durch α -Malzamyase. (1940). Differenzierung der Abbauprodukte durch β -Gerstenamyase und durch Gärung mit *S. carlsbergensis*.

Kleister 3,00 %, pH = 4,8, $t = 20,0^\circ$.
Reduktionsvermögen, ber. als Maltose, % TMB.

α -Amylase		β -Amylase		Durch β -Amylase spaltbare α -Dextrine	Durch β -Amylase gespaltene Bindungen in α -Dextrinen
Vor Gärung	Nach Gärung	Vor Gärung	Nach Gärung		
31,5	19,4	72,2	2,5	16,9	2,4
35,4	20,6	74,2	2,4	18,2	2,1
36,8	20,4	77,3	2,1	18,3	2,2
44,1	21,8	80,6	3,6	18,2	2,0

Tabelle 6. Abbau von Kartoffelstärke durch α -Subtilisamyase. (1950). Differenzierung der Abbauprodukte durch β -Gerstenamyase und durch Gärung mit *S. carlsbergensis*.

Kleister 2,00 %, pH = 5,5, $t = 40,0^\circ$.
Reduktionsvermögen, ber. als Maltose, % TMBR.

α -Amylase		β -Amylase nach α -Amylase und Gärung		Durch β -Amylase spaltbare α -Dextrine	Durch β -Amylase gespaltene Bindungen in α -Dextrinen	Total- abbau β - nach α -Amylase ber.
Vor Gärung	Nach Gärung	Vor Gärung	Nach Gärung			
41,7	22,0	72,6	3,8	18,2	2,8	92,3
54,1	22,4	57,8	5,2	17,2	2,1	89,5
60,7	21,7	51,1	5,5	16,2	1,8	90,1
67,3	19,8	48,2	4,1	15,7	1,8	95,7
70,2	18,1	44,5	4,3	13,8	1,9	96,6

Zwecks Differenzierung der vergärbaren Kohlenhydrate wurden in einem Versuch zwei verschiedene Organismen angewandt. 3 %iger Kleister von unbehandelter Kartoffelstärke wurde zuerst mit α -Subtilisamyase zu 36,0 % TMW, darauf mit β -Gerstenamyase zu 71,9 % TMW abgebaut. Trockensubstanz und Reduktionsvermögen wurden bestimmt vor und nach der Gärung mit *S. uvarum*, bzw. *S. carlsbergensis*.

Durch Bestimmung der Trockensubstanz wurde gefunden, dass *S. uvarum* 49,8 % TM, *S. carlsbergensis* 69,9 % TM vergären; durch Bestimmung des

Reduktionsvermögens, dass *S. uvarum* 53,8 % TMBR, *S. carlsbergensis* 67,4 % TMBR vergären. 30,1 % TM der Trockensubstanz sind unvergärbare Dextrine.

Nach Smits van Waesberghe vergärt *S. uvarum* nur Glucose und Maltose. Beim Vergleich des Reduktionsvermögens und der Trockensubstanz zeigt sich, dass die von *S. uvarum* vergärbaren Saccharide in unserem Versuch zu mehr als 90 % Maltose gewesen sind. *S. carlsbergensis* vergärt mehr als *S. uvarum*, nämlich 20,1 % TM der Trockensubstanz; hierbei handelt es sich um Trisaccharide, da das Reduktionsvermögen 13,6 % TMBR beträgt.

METHODIK

α -Amylase aus Malz. Ein Malzauszug wird mit Phosphatpuffer auf pH 7,0 eingestellt und 60 Minuten auf 60° C erwärmt. Die vollständige Zerstörung der α -Amylase wird nach den Angaben von Blom, Bak und Braae¹ kontrolliert.

*α -Amylase aus *B. subtilis*.* Eine 1 %ige Lösung eines Trockenpräparates von Subtilisamylase wird mit Phosphatpuffer auf pH 7,0 eingestellt und 15 Minuten auf 70° C erwärmt.

β -Amylase aus Gerste. Ein Gerstenauszug wird mit Acetatpuffer auf pH 4,0 eingestellt. Nach 4-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur ist jede Spur von α -Amylase zerstört. Zwecks Stabilisierung wird auf pH 5,0 eingestellt.

**S. carlsbergensis*.* Bierhefe wird von größeren Partikeln durch Sieben, von löslichen Bestandteilen durch wiederholtes Aufschlämmen in Wasser befreit.

**S. uvarum*.* Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Nederland.

Stärke. Kartoffelstärke, superior Qualität.

In den folgenden Versuchen wird genauer Kontakt mit der ursprünglichen Stärkemenge durch Wiegen vor und nach den einzelnen Manipulationen bewahrt.

Stärkeabbau durch α -Amylase. 10,00 g trockene, aschefreie Stärke werden in einem mit zugehörigem Propeller tarierten, weithalsigen 500 ml Duranrundkolben abgewogen und durch Rühren mit einem schnell laufenden Motor in 350 ml Wasser aufgeschlämmt. Ohne das Rühren zu unterbrechen, wird der Kolben in ein siedendes Wasserbad getaucht und nach 15 Minuten in ein Wasserbad von 20° (Versuche mit Malzamyase) oder von 40° (Versuche mit Subtilisamylase) überführt. Nach weiteren 15 Minuten wird das Rühren unterbrochen, Acetatpuffer, Enzymlösung und Toluol zugesetzt und der Inhalt mit Wasser auf 500,0 g gebracht. Das Gemisch wird nun 1 Minute gerührt und endlich der Kolben verschlossen. Nach passender Zeit (Vorversuche!) bei 20°, resp. bei 40° wird gekocht, um die Enzymwirkung zu sistieren und Toluol abzudampfen. Nach Abkühlung wird Wasser bis zum Gewicht wie vor dem Kochen zugesetzt.

Fortsetzung des Abbaus mit β -Amylase. a) Eine passende Menge β -Amylase und einige Tropfen Toluol werden zu der durch α -Malzamyase abgebauten Stärkelösung zugesetzt. Nach 20-stündigem Stehen bei 20° wird die Lösung einige Minuten gekocht, um die Enzymwirkung zu sistieren und Toluol abzudampfen. b) Eine passende Menge β -Amylase und einige Tropfen Toluol werden zu der durch α -Subtilisamylase abgebauten und vergorenen Stärkelösung (siehe später) zugesetzt. Nach 20-stündigem Stehen bei 40° wird die Lösung einige Minuten gekocht, um die Enzymwirkung zu sistieren und Toluol abzudampfen.

Gärung mit S. carlsbergensis. 50,0 g einer gekochten Lösung werden in einer 250 ml Flasche mit Patentverschluss abgewogen und mit 10,0 g einer Hefesuspension (entsprechend etwa 200 mg Trockensubstanz) versetzt. Die Gärung ist unter Schütteln bei ca. 32° C in 2 bis 3 Tagen vollendet. Die Hefe wird abfiltriert.

Gärung mit S. uvarum. 100,0 g der gekochten Lösung werden in einem 300 ml Erlenmeyerkolben abgewogen und durch halbstündiges Dampfen in 3 aufeinanderfolgenden Tagen sterilisiert. Der Kolben wird mit *S. uvarum* geimpft und bei ca. 28° inkubiert. Nach 2 bis 3 Wochen ist die Gärung vollendet. Es wird Wasser bis zu 100,0 g zugesetzt und die Hefe abfiltriert.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Abbau von Kartoffelstärkekleister durch α -Amylase aus Malz und aus *B. subtilis* verläuft auf dieselbe Weise. Es werden durch Bierhefe vergärbare und unvergärbare, reduzierende Spaltstücke gebildet. Die Anzahl der vergärbaren Spaltstücke steigt während des Abbaus ununterbrochen an. Die Anzahl der unvergärbaren Spaltstücke steigt anfangs ebenfalls an, erreicht aber ein Maximum, um später abzunehmen. Die Anzahl unvergärbbarer Spaltstücke ist maximal bei einem Stärkeabbau von 35 % TM bis 60 % TM und beträgt innerhalb dieser Grenzen 21 % TM. 6/7 (~ 18 % TM) der unvergärbaren Spaltstücke lassen sich durch β -Gerstenamylase in vergärbare Spaltstücke zerlegen.

Nach Abbau der Stärke durch α -Subtilisamylase bis ca. 40 % TM und weitergehendem Abbau durch β -Amylase aus Gerste bis ca. 70 % TM sind 50 % der Stärke in Disaccharid, 20 % in Trisaccharid und 30 % in unvergärbare Dextrine umgewandelt.

Wir möchten der Leitung der Tuborg-Brauereien für ihr wohlwollendes Entgegenkommen unseren Dank aussprechen.

LITERATUR

1. Blom, J., Bak, A., und Braae, B. *Z. physiol. Chem.* **250** (1937) 104.
2. Blom, J., und Rosted, C. O. *Acta Chem. Scand.* **1** (1947) 32.
3. Hopkins, R. H., und Kulka, D. *J. Inst. Brewing* (1942) 170.
4. Smits van Waesberghe, F. A. M. J. *Onderzoekingen over Microben-Amylasen.* (1941). Delft.
5. Blom, J., Braae, B., und Bak, A. *Z. physiol. Chem.* **252** (1938) 261.
6. Blom, J., und Schmith, T. *Acta Chem. Scand.* **1** (1947) 230.
7. Brown, H. T., und Millar, J. H. *J. Chem. Soc.* **75** (1899) 315.
8. Ling, A. R. In Walton, R. P. *A Comprehensive Survey of Starch Chemistry.* (1928) 27. New York.
9. Myrbäck, K. *Biochem. Z.* **307** (1940) 147.
10. Blom, J., und Rosted, C. O. *Acta Chem. Scand.* **1** (1947) 233.

Eingegangen am 14. März 1952.