Bindungstypen in der Stärke

JAKOB BLOM und BIRGIT SCHWARZ

Laboratorium der Tuborg-Brauereien, Kopenhagen, Dänemark

Untersuchungen über den enzymatischen Abbau der Stärke durch absolut α -freie β -Gerstenamylase und durch absolut β -freie α -Malzamyase führten uns¹ im Jahre 1936 zu der Ansicht, dass Stärke, respektive Stärkeabbauprodukte, Bindungen enthalten, welche

vorzugsweise von α -Amylase,
 vorzugsweise von β -Amylase,
 sowohl von α - als von β -Amylase,
 weder von α - noch von β -Amylase,
 ausschliesslich von Maltase

gespalten werden. Unsere Ansicht liess sich nicht mit der damals üblichen Auffassung, dass Stärke nur *einen* Bindungstypus — nämlich $1\alpha 4$ -Bindungen — enthält, in Einklang bringen. Selbst die heute übliche Auffassung, dass Stärke *zwei* Bindungstypen — nämlich neben $1\alpha 4$ -Bindungen noch $1\alpha 6$ -Bindungen — enthält, reicht nicht aus, um die Diskrepanz zu eliminieren. Diese Unstimmigkeit hat uns veranlasst, die Arbeit über die Bindungstypen in der Stärke fortzusetzen.

In der vorliegenden Abhandlung haben wir das Problem auf andere Weise angefasst, und zwar haben wir durch gleichzeitige Bestimmung des Drehungs- und des Reduktionsvermögens den Abbau verfolgt, um eventuelle Zusammenhänge zwischen diesen Eigenschaften und dem Aufbau der Stärke zu finden.

Für Vergleiche von Drehwerten ist es vorteilhaft nicht die spezifische Drehung $[\alpha]$, die auf die Gewichtseinheit des zu untersuchenden Stoffes bezogen ist, sondern die molekulare Drehung $[M]$, die sich auf gleiche Molekülzahlen bezieht, zu verwenden. Die Molrotation $[M]$ ist die Drehung einer Lösung von 1 Mol in 100 ml im 1 dm-Rohr gemessen. Zwischen Molrotation und spezifischer Drehung besteht folgende Beziehung:

$$[M] = \frac{[\alpha] \cdot M}{100} = \frac{\alpha \cdot M}{c \cdot l}$$

Tabelle 1. Molrotation von Glucose, Maltose und Isomaltose im Gleichgewichtszustand.

	M	$[\alpha]_D$	$[M]_D$
Glucose	180,2	52,7	95
Maltosehydrat	360,3	130,4	470
Isomaltose ²	342,3	120	411

Aus Stärkeabbauprodukten hat man nur die in Tabelle 1 angeführten drei Zuckerarten in kristallinischem Zustande isoliert.

Wir haben uns die Frage gestellt: welche Drehungsänderungen sind mit der Spaltung einer Glucosidbindung in der Stärke oder in Stärkeabbauprodukten verbunden, und zwar von Gleichgewichtszustand zu Gleichgewichtszustand gemessen.

Das einfachste Stärkeabbauprodukt, welches eine Glucosidbindung enthält, ist das Disaccharid Maltose. 360 mg Maltosehydrat, 1 mmol Maltose entsprechend, werden in Wasser gelöst; durch kurzes Erwärmen wird die Mutarotation aufgehoben. Nach Abkühlung auf 20,0° wird auf 100,0 ml verdünnt. Im 1 dm-Rohr, Natrium-Licht, ist die Drehung dieser Lösung 0,470°. Auf genau dieselbe Weise wird eine Lösung von 2 mmol Glucose bereitet. Diese Lösung zeigt eine Drehung von 0,190°. Bei Spaltung von 1 mmol Maltose entstehen 2 mmol Glucose. Bei dieser Reaktion ändert sich die Drehung von 0,470° bis 0,190° = 0,280°. Für 1 Mol ist die Änderung 280°. Diese Änderung bezeichnen wir mit $[\text{Sp}]_D$.

Stärke ist ein Polysaccharid ohne Reduktionsvermögen ausschliesslich aus Glucoseresten aufgebaut. Die Hydrolyse verläuft nach der Formel:

woraus sich berechnen lässt, dass aus 162 mg Stärke 180 mg Glucose gebildet werden. 180 mg Glucose sind 1 mmol. Die spezifische Drehung der Stärke ist 202°³; eine Lösung von 162 mg Stärke in 100,0 ml würde im 1 dm-Rohr eine

Drehung von $\frac{202 \cdot 162}{100} = 0,327^\circ$ zeigen. 180 mg Glucose in 100,0 ml Wasser

gelöst zeigen im 1 dm-Rohr eine Drehung von 0,095°. Bei der totalen Hydrolyse ändert sich die Drehung also um 0,232°. Bei dieser Reaktion ist 1 mmol reduzierender Zucker gebildet worden — in diesem Falle Glucose —, es ist mit anderen Worten 1 mmol Bindungen gespalten worden. Für die Spaltung von 1 Mol Bindungen ist die Drehungsänderung $[\text{Sp}]_D = 232^\circ$.

In diesen beiden Beispielen haben wir die Anzahl gespaltener Bindungen berechnen können, da wir wussten, wieviele Bindungen vorhanden waren,

und wir sie alle spalteten. Bei partiellem Abbau ist es dagegen notwendig die Anzahl gespaltener Bindungen zu bestimmen. Die Anzahl gespaltener Bindungen ist gleich der Anzahl gebildeter Moleküle reduzierender Saccharide. Wir sehen von der Anwesenheit von Bindungen des Trehalosetypus ab, welche bei Spaltung einer Bindung zur Bildung zweier Moleküle reduzierender Saccharide Anlass geben.

Die Anzahl reduzierender Saccharide wird durch das Reduktionsvermögen bestimmt. Voraussetzung ist, dass ein jedes Stärkeabbauprodukt, unabhängig von der Kettenlänge, dasselbe molare Reduktionsvermögen hat wie Glucose und Maltose. In der vorliegenden Arbeit haben wir zwei Methoden zur Bestimmung des Reduktionsvermögens angewandt, nämlich die Jodmethode von Willstätter-Schudel⁴ und die Kaliumkupferkarbonatmethode von Blom-Rosted⁵. Die Jodmethode hat einen stöchiometrischen Verlauf:

Kaliumkupferkarbonat hat dasselbe molare Oxydationsvermögen gegenüber Maltose wie gegenüber Glucose.

Alle unsere Bestimmungen der optischen Drehung sind nach Ablauf der Mutarotation und bei 20° mit Na-Licht, D-Linie, ausgeführt. Die angegebenen Werte sind also Gleichgewichtsdrehungen.

Um die von uns gestellte Frage zu beantworten, haben wir eine Reihe von Versuchen über die Hydrolyse von Kartoffelstärke, teils mit Säure, teils mit Enzym durchgeführt.

Ein 3 %iger Kleister, 0,08 N mit Hinblick auf Salzsäure, wird in verschlossenen Kolben bei 100° hydrolysiert. In passenden Intervallen wird ein Kolben aus dem kochenden Wasserbad genommen und auf 20° abgekühlt. Drehungs- und Reduktionsvermögen werden sofort bestimmt, um eventuelle Fehler durch Retrogradation möglichst zu eliminieren. Die Lösungen sind ohne Filtrieren verwendbar.

Die Resultate solcher Versuche sind in Tabelle 2 und 3 zusammengestellt. Die Änderung der Drehung per mmol gespaltener Bindungen ergibt sich durch Division der Differenzen zweier Werte von α_{korrt} und den zugehörigen Werten von R.

Beispiel: Tabelle 2. Hydrolysegrad 36,0 %—44,3 %

$$\frac{4,788 - 4,431}{8,27 - 6,71} = 0,229$$

$[\text{Sp}]_D$, die Änderung der Drehung per Mol gespaltener Bindungen, ist also 229°.

Tabelle 2. Säurehydrolyse von Kartoffelstärke. Kleister 3,00 %, pH ca. 1, t = 100°. Reduktion: Kaliumkupferkarbonatmethode. Drehung: 1 dm-Rohr.

Ver- suchs- reihe	Reduktion		Drehung korr. für Dichte α_{korr}	[Sp] _D von Punkt zu Punkt	[Sp] _D vom Nullpunkt zu Punkt
	Hydrolyse- grad %	mmol Zucker in 100,0 g Lösung R			
	0	0	6,068		
63	12,6	2,35	5,678	166	166
64	14,9	2,79	5,600	—	168
64	23,1	4,31	5,316	187	174
63	28,1	5,25	5,129	199	179
64	29,8	5,57	5,039	—	185
64	36,0	6,71	4,788	220	191
65	44,3	8,27	4,431	229	198
63	52,6	9,81	4,030	260	208
65	54,4	10,15	3,945	—	209
65	65,7	12,26	3,369	273	220
65	76,5	14,28	2,805	279	229
65	85,9	16,02	2,345	264	232
65	88,8	16,57	2,189	284	234

Tabelle 3. Säurehydrolyse von Kartoffelstärke. Kleister 3,00 %, pH ca. 1, t = 100°. Reduktion: Jodmethode. Drehung: 1 dm-Rohr.

Ver- suchs- reihe	Reduktion		Drehung korr. für Dichte α_{korr}	[Sp] _D von Punkt zu Punkt	[Sp] _D vom Nullpunkt zu Punkt
	Hydrolyse- grad %	mmol Zucker in 100,0 g Lösung R			
	0	0	6,068		
67	10,9	2,04	5,749	156	156
67	24,0	4,48	5,329	172	165
67	36,2	6,75	4,815	226	186
67	42,6	7,96	4,521	243	194
67	53,4	9,97	4,059	230	202
67	69,0	12,88	3,264	273	218
68	73,7	13,76	3,019	278	222
67	76,0	14,19	2,904	267	223
68	81,4	15,19	2,617	287	227
68	85,7	16,00	2,395	274	230
68	89,3	16,66	2,208	283	232
68	92,6	17,28	2,046	261	233

Diese Berechnung haben wir teils von Punkt zu Punkt, teils vom Nullpunkt zu jedem Einzelpunkt ausgeführt.

Im Nullpunkt hat R den Wert 0. $[\alpha]_D$ der von uns verwendeten Kartoffelstärke ist als $200,6^\circ$ bestimmt, und aus diesem Wert ist α_{korrt} für den Nullpunkt berechnet.

Die mit beiden Methoden zur Bestimmung des Reduktionsvermögens erhaltenen Resultate stimmen überein, so dass die beiden Tabellen gemeinsam diskutiert werden können.

Das Zahlenmaterial zeigt, dass $[\text{Sp}]_D$ nicht konstant ist. Von Punkt zu Punkt berechnet ist $[\text{Sp}]_D$ anfangs ca. 160° und steigt während des Abbaus, um bei einem Abbau von ca. 60 % seinen maximalen Wert ca. 280° zu erreichen.

Vom Nullpunkt berechnet steigt $[\text{Sp}]_D$ bis ca. 230° . Wie oben berechnet ist der durchschnittliche Wert von $[\text{Sp}]_D$ bei Spaltung aller Bindungen der Stärke 232° . Diesen Wert erreicht man bei einem Abbau von ca. 90 %.

Das Ergebnis, dass $[\text{Sp}]_D$ nicht konstant ist, kann nur dadurch gedeutet werden, dass mehr als ein Bindungstypus gespalten wird.

$[\text{Sp}]_D$ ist für die Glucosidbindung der Maltose 280° ; auf gleiche Weise findet man für die Glucosidbindung der Isomaltose $[\text{Sp}]_D = 221^\circ$. Sowohl 280° als 221° sind grösser als die Werte, welche wir zu Beginn der Säurehydrolyse finden. Es muss also ein dritter Bindungstypus in der Stärke sein, und dieser unbekannte dritte Bindungstypus wird zuerst hydrolysiert. Nach Hydrolyse von ca. 60 % aller Bindungen erreicht $[\text{Sp}]_D$ denselben Wert wie bei der Spaltung von Maltose. Es ist als ob hier nur Maltose oder Bindungen vom selben Typus wie in der Maltose gespalten werden.

Beim Abbau von Stärke durch α -Amylasen werden Mono-, Di-, Tri- und höhere Oligosaccharide gebildet. Beim Abbau durch β -Amylase entsteht nur Maltose. Mit β -Amylase sind die Verhältnisse also weit übersichtlicher, und wir haben deshalb vorgezogen den enzymatischen Abbau der Stärke durch β -Amylase zu untersuchen. Beim Abbau von Kartoffelstärkekleister durch β -Amylase besteht aber die Schwierigkeit, dass wohl das Reduktionsvermögen bestimmt werden kann, Polarisationsmessungen aber nicht möglich sind. Um klare Lösungen zu erhalten wird der Stärkeabbau nach Sistierung der β -Amylase mit Pankreasamylase fortgesetzt. In Intervallen werden das Reduktions- und das Drehungsvermögen bestimmt, um aus diesen Werten durch Extrapolation das Drehungsvermögen vor Zusatz der Pankreasamylase zu berechnen.

Die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Beim Abbau der Stärke durch β -Amylase zu 40–50 % TM hat $[\text{Sp}]_D$ vom Nullpunkt berechnet einen Wert von ca. 187° , welcher kleiner ist als 280° und 221° . Der Abbau mit β -Amylase zeigt wie die Säurehydrolyse, dass Stärke

Tabelle 4. Abbau von Kartoffelstärke durch β -Amylase. Fortsetzung des Abbaus durch Pankreasamylase. Kleister 3,00 %, pH = 6,8, t = 40°. Reduktion: Jodmethode. Drehung: 1 dm-Rohr.

Ver- suchs- reihe	Pankreasamylase nach β -Amylase				β -Amylase			
	Reduktion		Drehung korr. für Dichte	Neigung der Pankreas Geraden	Reduktion		Drehung berech- net	
	Abbau- grad	mmol Zucker in 100,0 g Lösung R			Abbau- grad	mmol Zucker in 100,0 g Lösung R		
	% TM	R	α_{korr}	$[\text{Sp}]_D$	% TM	R	α_{korr}	$[\text{Sp}]_D$
70	56,8	5,30	5,121	151	41,2	3,85	5,343	189
	64,2	6,00	5,017					
	68,4	6,39	4,956					
71	55,8	5,21	5,140	141	45,2	4,22	5,281	186
	61,4	5,73	5,073					
	66,5	6,20	5,000					
74	57,8	5,39	5,098	133	51,4	4,80	5,177	186
	59,8	5,58	5,069					
	62,5	5,83	5,042					
	65,3	6,10	5,007					
	68,5	6,39	4,962					

% TM: Prozent der Menge Maltose, die gebildet werden würde, falls Stärke sich total zu Maltose abbauen liesse.

einen Bindungstypus enthalten muss, welcher verschieden ist sowohl von der Bindung in der Maltose als von derjenigen in der Isomaltose.

Es ist nun naheliegend, sich die Frage zu stellen, wie dieser dritte Bindungstypus beschaffen ist.

Aus dem hohen Drehungsvermögen lässt sich schliessen, dass β -Bindungen in grösserer Anzahl nicht am Aufbau der Stärke beteiligt sein können ⁶.

Bei der totalen Hydrolyse der Stärke entsteht ausschliesslich Glucose.

Die Hydrolysenprodukte totalmethylierter Stärke sind ⁷⁻¹⁰

85—90 %	2,3,6-Trimethylglucose,
ca. 5 %	2,3,4,6-Tetramethylglucose,
ca. 5 %	2,3-Dimethylglucose.

Die nicht methylierten OH-Gruppen der Stärke sind vor Methylierung durch Bindungen geschützt. Diese Bindungen sind teils Glucosidbindungen zwischen

1-4-Brücke und 1-5-Ring *1-5-Brücke und 1-4-Ring* *Maltose* *Kette von alternierenden Pyranose- und Furanosereste*

zwei Glucoseresten, teils Ringbindungen innerhalb desselben Glucoserestes. Der Ring kann entweder zwischen OH-Gruppen an C₁ und C₅ oder zwischen OH-Gruppen an C₁ und C₄ geschlossen sein. Im ersten Falle handelt es sich um einen Pyranoserest, im zweiten Falle um einen Furanoserest.

2,3,4,6-Tetramethylglucose kann nur aus endständigen Pyranoseresten herühren. 2,3,6-Trimethylglucose stammt aus unverzweigten, nicht-endständigen Kettengliedern. 2,3-Dimethylglucose stammt aus verzweigten, mittleren Kettengliedern und unterscheidet sich nur von 2,3,6-Trimethylglucose dadurch, dass die OH-Gruppe an C₆ an der Isomaltosebindung beteiligt gewesen ist.

Die Bildung von 2,3,6-Trimethylglucose besagt, dass die OH-Gruppen an C₁, C₄ und C₅ in der Stärke sich an Bindungen beteiligen. Eine Glucosidbindung geht von C₁ aus. Hat der andere Glucoserest einen Pyranosering, kann die Bindung nur an C₄ anknüpfen, und hat der andere Glucoserest einen Furanosering, kann die Bindung nur an C₅ anknüpfen.

Es gibt nur diese beiden Möglichkeiten:

- 1-5-Ring und 1-4-Brücke,
- 1-4-Ring und 1-5-Brücke.

Beim Abbau der Stärke mit β -Amylase wird ausschliesslich Maltose gebildet, und zwar in einer Menge von ca. 56 % ^{1, 11}, entsprechend einer Spaltung von 28 % aller Bindungen der Stärke. Maltose enthält eine 1—4-Brücke. Lassen wir eine Bildung von Maltose durch sekundäre Synthese ausser Betracht, folgt, dass Stärke 1—4-Brücken und infolge dessen Pyranosereste enthalten muss. β -Amylase bildet ein Disaccharid, spaltet also nur jede zweite Bindung. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass ein Unterschied besteht zwischen der Bindung, die gespalten wird, und der Bindung, die ungespalten hinterlassen wird, mit anderen Worten, dass zwei Bindungstypen alternieren. Da es nur zwei Möglichkeiten gibt, muss β -Amylase eine 1—5-Bindung spalten und die 1—4-Bindung intakt lassen. Eine 1—5-Bindung kann nur an einem Furanoserest anknüpfen, weshalb in den Ketten, die β -Amylase angreift, Pyranose- und Furanosereste alternieren müssen.

Die Konstitution des Doppelgliedes, das zwischen zwei 1—5-Brücken liegt, unterscheidet sich von der der Maltose dadurch, dass der Glucosylrest einen Furanosering enthält. Da Ringänderungen in Glucosiden nicht freiwillig verlaufen ¹², müssen enzymatisch bedingte Reaktionen vor sich gehen, welche sich in summa in einer Umlagerung des Furanoseringes in einen Pyranosering zu erkennen geben. β -Amylase muss sowohl die 1—5-Brücke als den 1—4-Ring öffnen, also zwei Acetalbindungen an benachbarten C-Atomen hydrolysieren. Nach Freiwerden der OH-Gruppe an C₅ stabilisiert sich das Molekül unter Bildung eines Pyranoseringes zu Maltose.

Man kennt sowohl Pyrano- als Furanoglucoside (Tabelle 5). In allen Fällen ist die Molrotation der Furanoside ca. 100° niedriger als die der Pyranoside. Eine Umlagerung eines Furanosids in das entsprechende Pyranosid würde mit einem Ansteigen der Molrotation um ca. 100° verbunden sein. Eine Umlagerung eines Furanoseringes in einen Pyranosering würde den Wert für $[\text{Sp}]_D$ der Spaltung einer α -Glucosidbindung um ca. 100° vermindern, ohne Rücksicht darauf ob Spaltung und Umlagerung am selben Glucoserest oder an

Tabelle 5. Molrotation von Glucosiden.

	M	Pyranosid		Furanosid		Differenz
		$[\alpha]_D$	$[\text{M}]_D$	$[\alpha]_D$	$[\text{M}]_D$	$[\text{M}]_D$
α -Methylglucosid	194,2	158,9 ¹³⁾	309	118 ¹⁴⁾	229	80
β -Methylglucosid	194,2	— 34,2 ¹³⁾	— 66	— 77 ¹⁴⁾	— 150	84
α -Äthylglucosid	208,2	152,0 ¹⁵⁾	316	101 ¹⁴⁾	210	106
β -Äthylglucosid	208,2	— 36,7 ¹⁵⁾	— 76	— 86 ¹⁴⁾	— 179	103

zwei verschiedenen Glucoseresten stattfinden. Für Maltose ist $[\text{Sp}]_D = 280^\circ$, für Isomaltose 221° , also wesentlich höher als die Werte, die wir anfangs bei der Säurehydrolyse finden oder beim Abbau der Stärke durch β -Amylase beobachten. Dieser Befund harmoniert also mit unserer Anschauung über die Anwesenheit von Furanoseresten in der Stärke.

Hypothesen, dass Stärke aus alternierenden Pyranose- und Furanoseresten aufgebaut ist, sind früher aufgestellt worden, zuerst von Kuhn¹⁶, später von Sutra¹⁷. Hanes¹⁸ hat sich eingehend mit der enzymatischen Seite dieser Frage beschäftigt; er kam zu dem Schluss, dass Stärke nach der Haworth'schen Formel, also ausschliesslich aus Pyranoseresten aufgebaut sein muss. Auf Grund von reaktionsstatistischen und reaktionskinetischen Messungen war auch Freudenberg^{19, 20} zu dem Ergebnis gekommen, dass Stärke nur oder fast nur α -Pyranosebindungen enthält. Wären in der Stärke auch Furanosebindungen, müssten diese nach seiner Meinung mit grösserer Geschwindigkeit hydrolysiert werden und sich bei kinetischen Messungen verraten. Haworth²¹ hatte nämlich gefunden, dass Methyl- und Äthylglucofuranoside 50 bis 200 Mal schneller hydrolysiert werden als die entsprechenden Pyranoside. Andere Untersuchungen²² zeigen indessen, dass Veränderungen in der Glykosylgruppe wie im Aglykon die Hydrolysegeschwindigkeit stark beeinflussen. Ja, später hat Haworth²³ einen Fall gefunden, wo das Furanosid stabil, das Pyranosid labil ist. Ein mittlerer Glucoserest in der Stärke ist im Verhältnis zu seiner einen Glucosidbindung Glykosylgruppe, im Verhältnis zu seiner anderen Aglykon. Zudem ist er durch Substitution mit Ketten belastet. Die Verhältnisse sind also von denen in den einfachen Alkylglucosiden so verschieden, dass die Annahme einer geringeren Stabilität der Furanosidbindungen in der Stärke nicht unmittelbar einleuchtend ist.

Freudenbergs Versuche¹⁹ wurden mit Lösungen von Stärke in 50 %iger Schwefelsäure ausgeführt. Der einzelne Versuch dauerte 2–3 Wochen und war mit einer Drehungsabnahme von nur $1,1^\circ$ verbunden. Unsere Versuchsbedingungen sind ungleich milder und die Drehungsänderungen 5 bis 15 Mal grösser.

METHODIK

Stärke: Kartoffelstärke. Superior Qualität.

β -Amylase: Ein Gerstenauszug wird durch Ansäuern (pH 3,8, 0° , 16 Stunden) von jeder Spur von α -Amylase befreit. Durch Fällung mit Tannin wird ein Dauerpräparat hergestellt.

Pankreasamylase: Aus frischem Schweinepankreas wird nach üblichen Methoden ein Dauerpräparat hergestellt.

Bestimmung des Drehungsvermögens: Polarisationsapparat von Schmidt & Haensch, Monochromator, D-Linie, 4 dm-Rohr, 19° – 21° .

Bestimmung des Reduktionsvermögens: Eine passende Menge der zu untersuchenden Lösung wird auf der Analysenwaage abgewogen, der Überschuss an Salzsäure mit der berechneten Menge 2 N NaOH abgestumpft und evt. Wasser bis zu 10 ml zugesetzt.

Kaliumkupferkarbonatmethode nach Blom-Rosted ⁵.

Jodmethode nach Willstätter-Schudel: Die in einem 100 ml Stehkolben abgewogene und wie soeben beschrieben vorbereitete Probe wird mit 10,00 ml 0,1 N Jod und 10 ml 0,5 M Na_2CO_3 versetzt. Der Kolben wird verschlossen im Dunkeln aufbewahrt. Nach 40 Minuten wird mit 10 ml 1 M H_2SO_4 angesäuert und der Jodüberschuss sofort mit 0,1 N Thiosulfat zurücktitriert, wobei mindestens 3,5 ml verbraucht werden müssen. Die Jodlösung wird mittels einer automatischen Pipette, die Thiosulfatlösung mittels einer 10 ml, in 0,02 ml eingeteilten, Bürette hinzugesetzt. Beide Apparate sind von P. Haack, Wien geliefert.

Bei Bestimmung des Reduktionsvermögens in Stärkelösungen, welche nur durch β -Amylase abgebaut sind, ist auf Folgendes zu achten. Bei der Zugabe von Jod entsteht eine blauschwarze Flockung, welche bei der Rücktitration des Jodes nur langsam in Lösung geht. Die Thiosulfatlösung soll langsam zugesetzt, und kurz vor dem Umschlag soll nach Zugabe jeden Tröpfchens sehr kräftig geschüttelt werden.

Stärkekleister: 15,00 g trockene, aschenfreie Stärke werden in einem mit zugehörigem Propeller tarierten, weithalsigen 500 ml Duranrundkolben abgewogen und durch Rühren mit einem schnell laufenden Motor in 400 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° überführt. Nach weiteren 15 Minuten wird das Rühren unterbrochen. Je nachdem, ob der Kleister für eine Hydrolyse durch Säure oder Amylasen verwendet werden soll, verfährt man wie in den nächsten Abschnitten beschrieben.

Hydrolyse durch Säure: Zum Kleister werden 10,0 ml 4 N HCl zugesetzt und der Inhalt des Kolbens auf 500,0 g aufgewogen. pH = 1,1. Nach kurzem Umrühren wird der Stärkekleister auf 5 bis 8 100 ml Stehkolben verteilt. Nach Verschliessen werden alle Kolben in ein grosses siedendes Wasserbad getaucht. In Intervallen wird ein Kolben aus dem Bad genommen und auf 20° abgekühlt. Die Lösung wird nicht filtriert.

Abbau durch Amylasen: Der Kleister wird mit 5,0 ml 0,2 M Na_2HPO_4 , 5,0 ml 0,2 M KH_2PO_4 und ca. 50 mg des β -Amylasenpräparates versetzt und eine Minute gerührt. Der Kolben wird nun verschlossen in ein Wasserbad von 40° getaucht. Nach passender Zeit (1 bis 4 Stunden) wird pH von 6,8 auf ca. 1 durch 10,0 ml 4 N HCl verschoben. Bei dieser Acidität wird die β -Amylase schnell zerstört. Nach ca. 10 Minuten wird pH wieder auf 6,8 durch 20,0 ml 2 N NaOH zurückgeführt. Eine Probe von ca. 50 g wird zur Bestimmung des Reduktionsvermögens entnommen. Zum Rest werden ca. 10 mg des Pankreaspräparates hinzugesetzt und der Kolben nach kräftigem Schütteln wieder im Wasserbade von 40° angebracht. In passenden kurzen Intervallen werden Proben von ca. 90 g in tarierte Kolben, die ca. 2 g 4 N HCl enthalten, gegossen. Dadurch wird pH wieder auf ca. 1 verschoben, um die Wirkung der Pankreasamylase zu sistieren. Nach Abkühlen werden die Lösungen durch 9 cm Filter, worauf ca. 75 mg Kieselgur angebracht sind, filtriert. Nur die letzten 25 ml des Filtrates werden zur Bestimmung von Drehung, Dichte und Reduktion benutzt.

Während des ganzen Versuches wird durch Wiegen vor und nach den einzelnen Manipulationen genauer Kontakt mit der ursprünglichen Stärkemenge bewahrt.

Zwecks Bestimmung der Blindwerte werden vollständige Parallelversuche ohne Stärke durchgeführt.

Nach der Methode der kleinsten Quadrate wird die Neigung, $[\text{Sp}]_D$, der Geraden durch die Pankreaspunkte und daraus das Drehungsvermögen, welches dem Reduktionsvermögen nach Sistierung der β -Amylase entspricht, berechnet.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Hydrolyse von Kartoffelstärkekleister durch Salzsäure (0,08 N, 100°) wird durch gleichzeitige Messungen von Drehungs- und Reduktionsvermögen verfolgt. Die Resultate lassen sich nur dadurch erklären, dass Stärke ausser den bekannten Bindungen vom 1—4- und 1—6-Typus noch Bindungen von einem dritten Typus enthält. Dieses Ergebnis lässt sich mit der Bildung von 85—90% 2,3,6-Trimethylglucose bei der Säurehydrolyse methylierter Stärke in Einklang bringen durch die Annahme der Anwesenheit von Glucofuranose-resten, welche wiederum Bindungen vom 1—5-Typus bedingen.

Der Abbau von Kartoffelstärkekleister durch β -Gerstenamylase ist auf ähnliche Weise untersucht. Aus diesen Versuchen und dem Befund, dass β -Amylase ausschliesslich ein Disaccharid und zwar Maltose bildet, muss der Schluss gezogen werden, dass in dem Teil der Stärke, welcher von β -Amylase angegriffen wird, Pyranose- und Furanosereste alternieren. β -Amylase spaltet die 1—5-Bindung zwischen einem Pyranose- und einem Furanoserest und öffnet den Furanosering, worauf das Zwischenprodukt sich zu Maltose stabilisiert.

Die [Verfasser wünschen der Leitung der Tuborg-Brauereien] ihren Dank auszusprechen.

LITERATUR

1. Blom, J., Bak, A., und Braae, B. *Z. physiol. Chem.* **241** (1936) 273.
2. Montgomery, E. M., Weakley, F. B., und Hilbert, G. E. *J. Am. Chem. Soc.* **71** (1949) 1682.
3. Clendenning, K. A., und Wright, D. E. *Can. J. Research.* **23 B** (1945) 131.
4. Willstätter, R., und Schudel, G. *Ber.* **51** (1918) 780.
5. Blom, J., und Rosted, C. O. *Acta Chem. Scand.* **1** (1947) 32.
6. Meyer, K. H., Hopff, H., und Mark, H. *Ber.* **62 B** (1929) 1103.
7. Freudenberg, K., und Boppel, H. *Ber.* **71 B** (1938) 2505.
8. Freudenberg, K., und Boppel, H. *Ber.* **73 B** (1940) 609.
9. Peat, S., und Whetstone, J. *J. Chem. Soc.* **1940** 276.
10. Hess, K., Schulze, H. A., und Krajnc, B. *Ber.* **73 B** (1940) 1069.
11. Hopkins, R. H., Murray, R. H., und Lockwood, A. R. *Biochem. J.* **40** (1946) 507.
12. Haworth, W. N., und Porter, C. R. *J. Chem. Soc.* **1929** 2796.
13. Riiber, C. N. *Ber.* **57 B** (1924) 1797.
14. Haworth, W. N., Porter, C. R., und Waine, A. C. *J. Chem. Soc.* **1932** 2254.
15. Ferguson, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **54** (1932) 4086.
16. Kuhn, R. *Ann.* **443** (1925) 1.
17. Sutra, R. *Le Problème de la Constitution de l'Amidon.* (1934) 35. Paris, Herman & Cie.

18. Hanes, C. S. *New Phytologist* **36** (1937) 101.
19. Freudenberg, K., Kuhn, W., Dürr, W., Boltz, F., und Steinbrunn, G. *Ber.* **63 B** (1930) 1510.
20. Freudenberg, K., und Kuhn, W. *Ber.* **65 B** (1932) 484.
21. Haworth, W. N. *Ber.* **65 A** (1932) 50.
22. Pigman, W. W., und Goepp, Jr., R. M. *Chemistry of the Carbohydrates*. (1948) 202—206. New York, Academic Press.
23. Haworth, W. N., Owen, L. N., und Smith, F. J. *Chem. Soc.* **1941** 88.

Eingegangen am 30. April 1952.