

### 167. Hans Pringsheim und Eugen Schapiro: Über den fermentativen Abbau der Stärke durch »Biolase«. (Beiträge zur Chemie der Stärke, XVI<sup>1</sup>.)

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 29. März 1926.)

Zu einem neuartigen fermentativen Stärke-Abbau sind wir durch die Verwendung eines Fermentpräparates gelangt, welches von der Firma Kalle & Co. für technische Zwecke zum Entschlichten von Geweben in den Handel gebracht wird, und für das sich diese Firma den Namen „Biolase“ hat schützen lassen. Es wird dem Ferment nachgerühmt, daß es die Fähigkeit besitze, die Stärke bei hohen Temperaturen mit außerordentlicher Schnelligkeit aufzulösen, ohne daß dabei in wahrnehmbarer Menge reduzierende Zucker gebildet werden. Wir kennen nicht den Ursprung dieses eigenartigen Ferments, der von der Firma Kalle & Co. geheim gehalten wird; aus gewissen Eigenschaften, besonders der großen Resistenz des Enzyms gegenüber Hydroxyl-Ionen, sowie seiner auffallend hohen Tötungstemperatur, könnte angenommen werden, daß es sich um die Diastase des *Bacillus mesentericus vulgatus*<sup>2)</sup> handelt, der diese Eigenschaften zukommen, auch an den *Bacillus subtilis*<sup>3)</sup> wäre zu denken. Doch sind diese Analogien für eine Identitätserklärung nicht ausreichend.

Eine Eigenart der Biolase ist ihre außerordentliche Haltbarkeit in wäßriger Lösung, besonders seltsam dadurch, daß diese Lösung alkalisch ist: Wir stellten fest, daß ihr eine Wasserstoff-Zahl von  $p_H = 7.2$  zukommt. Bei der Untersuchung der Aktivitäts- $p_H$ -Kurve fanden wir eine breite optimale Zone zwischen  $p_H = 5.4$  und  $p_H = 7.0$ . Im alkalischen Gebiet erstreckt sich die energische Wirkung bis zu  $p_H = 7.6$ , während im sauren Gebiet die Aktivität schon bei  $p_H = 4.7$  auf die Hälfte vermindert ist.

Eine weitere Eigenart des Ferments ist seine relativ große Hitze-Beständigkeit, welche die an sich nicht geringe anderer Amylasen noch bei weitem übertrifft. Die verflüssigende Kraft des Fermentes ist bei hohen Temperaturen besonders groß; bei 80° wird das Stärke-Gel mit größter Schnelligkeit zum Sol, ja diese Umwandlung gelingt momentan auch noch bei 90–95°. Gerade bei diesen hohen Temperaturen ist die gleichzeitige Zuckerbildung gering.

Obgleich unser Ferment nicht die Fähigkeit besitzt, Maltose in Glucose umzuwandeln, bildet es bei niederer Temperatur, z. B. bei 37°, aus Stärke vornehmlich Glucose. Wir vermuteten zuerst, daß diese Umwandlung der Stärke auf die früher<sup>4), 1)</sup> geschilderte Ferment-Symbiose zurückzuführen sei; doch konnten wir uns vom Gegenteil überzeugen, da die Biolase die Amylobiose, welche das charakteristische Substrat der  $\beta$ - oder Malz-Amylase ist, nicht spaltet. Glucose muß also durch die Biolase aus Stärke auf andere Weise durch einen noch unbekanntem Eingriff in das konfigurativ-asymmetrische Molekül unseres Polysaccharides hervorgehen.

Auch bei niederer Temperatur bildet sich neben der Glucose ein reduzierendes Polysaccharid, welches zunächst durch sein wohlkristallisierendes,

1) XV. Mitteilung voranstehend.    2) J. Effront, C. r. **164**, 415 [1917].

3) Cl. Fermi, Arch. f. Hyg. **10**, 1 [1890].

4) H. Pringsheim und J. Leibowitz, B. **58**, 1262 [1925].

wasserlösliches Phenylsazon,  $C_{30}H_{42}O_{14}N_4$ , als ein Trisaccharid charakterisiert werden konnte. Die Isolierung des Trisaccharids gelang uns auf Grund der Beobachtung, daß es bei Vornahme der Stärke-Verzuckerung durch Biolase bei  $70^{\circ}$  als überwiegendes Reaktionsprodukt entsteht. Daneben bildet sich nur wenig Glucose und etwas eines reduzierenden, aber kein Osazon liefernden Dextrins, welches bei Temperaturen über  $80^{\circ}$  zum Hauptprodukt der Spaltung wird.

Die Gewinnung des Trisaccharids aus der bei  $70^{\circ}$  geleiteten Amylolyse geschah am besten durch Vergärung der Glucose; und zwar eignet sich hierzu der maltase- und maltozymase-freie *Saccharomyces marxianus*, da gewöhnliche Bierhefe, wie wir sehen werden, auf den Zucker spaltend einwirkt. Aus der vergorenen Lösung gewinnt man nach der üblichen, im experimentellen Teil beschriebenen Reinigung den Zucker durch fraktionierte Alkohol-Fällung als weißes, an der Luft zerfließliches Pulver, das nun das Trisaccharid-osazon frei von jeder Spur Glucosazon liefert. Die Analyse ergibt, nach Abzug der Asche, auf die Trisaccharid-Formel  $C_{18}H_{32}O_{16}$  stimmende Werte; doch verhin derte dieser nicht unbedächtige, offenbar aus der Biolase stammende, Aschegehalt vorläufig die Molekulargewichts-Bestimmung durch Kryoskopie in Wasser. Wir haben den Zucker mit Essigsäure-anhydrid und Pyridin acetyliert und das richtige Molekulargewicht des Acetates in Benzol ermittelt.

Der Zucker zeigt in wäßriger Lösung starke Mutarotation: Für die Anfangsdrehung läßt sich ein Wert von  $+160^{\circ}$  bis  $+165^{\circ}$  extrapolieren; im Laufe von 24 Stdn. stellt sich bei allen Präparaten der konstante Wert von  $+128^{\circ}$  bis  $+129^{\circ}$  ein.

Die Trisaccharid-Natur unseres Stärke-Abbauproduktes, seine spezifische Drehung, sowie der Zersetzungspunkt seines Osazons ( $120-122^{\circ}$ ) machen es wahrscheinlich, daß wir die „ $\beta$ -Glucosido-maltose“ von Ling und Nanji<sup>5)</sup> in den Händen hatten; allerdings ist hervorzuheben, daß die englischen Forscher nur die Anfangsdrehung angeben.

Die Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung des Trisaccharids, welches Ling und Nanji aus Amylopektin, von ihnen  $\alpha$ ,  $\beta$ -Hexaamylose genannt, durch mit Alkohol gefällte Malz-Amylase gleichfalls bei  $70^{\circ}$  gewonnen haben, und unserem Trisaccharid wird durch die Übereinstimmung des Verhaltens der beiden Produkte gegenüber Fermenten erhöht. Nach den Angaben von Ling und Nanji ist ihr Zucker sowohl durch Hefe-Maltase wie durch Emulsin spaltbar, und zwar wird in beiden Fällen aus dem Trisaccharid 1 Mol. Glucose abgespalten. Auch wir beobachteten die Spaltung durch Hefe-Auszug und Emulsin; war die Wirkung des letzteren schwächer als in den Lingschen Versuchen, so bringen wir das mit der Tatsache in Beziehung, daß unsere Emulsin-Präparate auch Stärke nur sehr langsam angriffen. Beide Spaltungen werden wohl auf die Emulsin-Amylase<sup>6)</sup> und nicht auf die  $\beta$ -Glucosidase zurückzuführen sein; damit ist zum Ausdruck gebracht, daß wir in der „Iso-maltose“ kein normales  $\beta$ -glucosidisches Disaccharid, sondern eher einen erhalten gebliebenen  $\gamma$ -glucosidischen Komplex<sup>7)</sup> aus der Stärke erblicken<sup>8)</sup>.

<sup>5)</sup> A. R. Ling und D. R. Nanji, Soc. **123**, 2666 [1923], **127**, 629 [1925].

<sup>6)</sup> H. Pringsheim und J. Leibowitz, B. **58**, 1262 [1925]; K. Josephson, B. **58**, 2726 [1925]; vergl. auch die voranstehende Mitteilung.

<sup>7)</sup> vergl. auch A. R. Ling und D. R. Nanji, Soc. **127**, 629, und zwar S. 630, Anmerkung.

<sup>8)</sup> H. Pringsheim, Naturwiss. **13**, 1084 [1925].

Diese Auffassung erhält eine Stütze durch die Beobachtung, daß auch maltasefreie Pankreatin-Präparate aus unserem Zucker Glucose abspalten, was indirekt für die schon früher<sup>6)</sup> wahrscheinlich gemachte Identität der Emulsin- und der Pankreas-Amylasen ( $\alpha$ -Amylasen) spricht. Wir stellten ferner fest, daß das Trisaccharid auch von „Taka-Diastase“, die  $\alpha$ -Amylase und Maltase enthält, sowie von „Glucomaltase“<sup>9)</sup>-haltigem Malz-Auszug gespalten wird. Die chemische Natur des Trisaccharids ist somit, was den „Isomaltose“-Teil betrifft, noch ungeklärt; aber auch für das Vorhandensein einer Maltose-Bindung ist — nach unseren Erfahrungen beim Stärke-Abbau — die Entstehung von Maltose nach der Abspaltung eines Glucose-Restes kein völlig sicherer Beweis<sup>8)</sup>.

**Beschreibung der Versuche.**

**Aktivitäts-pH-Kurve der Biolase.**

Zusammensetzung der Lösungen: 20 ccm 1.61-proz. Stärke-Lösung, }  
 10 „ Puffer-Lösung, } bei 37°.  
 18 „ Wasser,  
 2 „ Biolase.

Titrationen mit je 5 ccm; Reduktionsvermögen in ccm  $n_{10}$ -KMnO<sub>4</sub>.

PH =	4.0	4.8	5.4	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6
Min.	Citrat		Phosphat					
30	0	1.70	2.25	1.95	2.04	2.00	2.10	2.00
90	0	1.95	2.34	2.20	2.20	2.16	2.32	2.11
180	0	2.10	2.75	2.60	2.48	2.40	2.40	2.25
1440	0	2.06	3.70	3.70	3.80	3.60	3.45	3.16

**Aktivität der Biolase bei erhöhter Temperatur.**

Zusammensetzung der Lösung: 20 ccm 1.61-proz. Stärke-Lösung, }  
 28 „ Wasser, } bei 90—95°.  
 2 „ Biolase.

Die Stärke- und die Biolase-Lösungen wurden vor dem Zusammengießen auf die Versuchs-Temperatur vorgewärmt.

Titrationen mit je 5 ccm:

Min. ....	0	10	30	60
ccm $n_{10}$ -KMnO <sub>4</sub> 0	0	1.90	1.98	2.15.

**Abbau der Stärke durch Biolase bei 37°.**

Ein in der üblichen Weise dargestellter Stärkekleister (50 g Stärke in 1 l Wasser) wurde durch Zugabe von 25 ccm der käuflichen Biolase-Lösung verflüssigt und die Lösung bei 37° der weiteren Einwirkung des Fermentes überlassen. Auf die anfangs energische Spaltung folgte eine längere langsame Nachverzuckerung:

Titrationen mit je 2 ccm:

Zeit in Stdn. ....	48	140	164
ccm $n_{10}$ -KMnO <sub>4</sub> ....	12.4	13.2	13.3
Spaltung in % <sup>10)</sup> ....	37	40	41

<sup>9)</sup> J. Leibowitz und P. Mechlinski, H. (im Druck).

<sup>10)</sup> willkürlich auf Glucose berechnet.

Die verzuckerte Lösung wurde filtriert, durch Fällung mit kolloidaler Eisenhydroxyd-Lösung enteiweißt, im Vakuum auf ein kleines Volumen eingedampft und mit 80-proz. Alkohol gefällt. Den Niederschlag zogen wir mehrfach mit warmem 80-proz. Alkohol aus, wobei die Hauptmenge der Dextrine zurückblieb. Der nach dem Verdampfen der vereinigten alkoholischen Auszüge erhaltene Zuckersirup wurde in Wasser gelöst und mit essigsauerm Phenyl-hydrazin erhitzt: Es fiel schon in der Hitze reichlich Glucosazon aus.

Schmp. 205—208°;  $[\alpha]_D = (-0.26^0 \times 5) : (0.033 \times 0.5) = -78.8^0$  (in Pyridin-Alkohol).  
Spezifische Drehung von Glucosazon  $-75^0$ <sup>11)</sup>.

Aus der heiß vom Glucosazon filtrierten Lösung schied sich beim Abkühlen ein zweites, gleichfalls krystallinisches Osazon aus, dessen Zersetzungspunkt nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Wasser bei 120° lag und sich beim weiteren Umkrystallisieren nicht mehr änderte (Schmp. des Maltosazons: 206°, des Trisaccharid-osazons von Ling und Nanji: 122°). Die Ausbeute betrug etwa ein Viertel der Glucosazon-Menge.

Mikro-Kjeldahl-Bestimmung (ausgeführt an zwei verschiedenen Präparaten):  
0.0108, 0.0099 g Sbst. verbrauchten 3.31, 2.97 ccm  $n_{150}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. — Gef. N 8.58, 8.40.  
Für C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>O<sub>14</sub>N<sub>4</sub> ber. N 8.21; für C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>9</sub>N<sub>4</sub> ber. N 10.79.

#### Abbau der Stärke durch Biolase bei 70°.

50 g Stärke werden mit 1 l Wasser verkleistert. Den Kleister erhitzten wir erst auf 70° und setzten 25 ccm Biolase hinzu, wobei augenblicklich Verflüssigung eintrat. Wir hielten die Lösung noch ca. 5 Stdn. auf derselben Temperatur, filtrierten dann, enteiweißten mit Fe(OH)<sub>3</sub> und konzentrierten im Vakuum auf ca. 400 ccm. Nun wurde die gut ausgewaschene Hefe (*Saccharomyces marxianus*)<sup>12)</sup> zugesetzt; als nach dem Aufhören der Kohlen-säure-Entwicklung nach ca. 48 Stdn. der Zusatz einer weiteren Hefeprobe keine neue Gärung verursachte, wurde wieder filtriert, enteiweißt, im Vakuum zum Sirup eingedampft und letzterer mit 80-proz. Alkohol gefällt. Das Zucker-Dextrin-Gemisch wurde mehrmals mit siedendem Alkohol ausgezogen; die gesammelten alkoholischen Auszüge entfärbten wir mit Tierkohle, dampften im Vakuum ein und verrieben schließlich den zurückbleibenden Sirup mit absol. Alkohol zu einem weißen Pulver. Ausbeute 25—30 g. Das so gewonnene Produkt gab mit essigsauerm Phenyl-hydrazin das reine Trisaccharid-osazon in langen, gelben Nadeln; Schmp. 120—122°.

0.0514 g Sbst.: 3.70 ccm N (23°, 737.4 mm).

C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub> (: N. NH. C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> (682.53). Ber. N 8.21. Gef. N 8.05.

Der freie Zucker ist eine äußerst hygroskopische Substanz; löslich in warmem Pyridin und in siedendem Alkohol, aus dem er sich beim Abkühlen als strahlige, unter dem Mikroskop deutlich krystallinische Masse abscheidet, die jedoch nach Entfernung des Alkohols zerfließt. Auch dieses Verhalten stimmt mit den Angaben von Ling und Nanji<sup>13)</sup> überein. Für die Analyse

<sup>11)</sup> C. Neuberg, B. 32, 3384 [1899].

<sup>12)</sup> Die Hefe wurde auf einem mit Schlammkreide neutralisierten und sterilisierten Nährboden von Rosinensaft herangezüchtet, auf den eine Probe einer Reinkultur vom Institut für Gärungsgewerbe übergeimpft worden war.

<sup>13)</sup> Soc. 123, 2666, und zwar S. 2678.

(ausgeführt an drei verschiedenen Präparaten) und die Drehungsbestimmung wurde der Zucker bei  $78^{\circ}$  über  $P_2O_5$  getrocknet.

0.1521, 0.1138, 0.1158 g Sbst.: 0.2239, 0.1703, 0.1748 g  $CO_2$ , 0.0825, 0.0645, 0.0638 g  $H_2O$ , 0.0088, 0.0044, 0.0049 g Asche.

$C_{18}H_{32}O_{16}$  (504.35).

Ber. C 42.85, H 6.40.

Gef. „<sup>14)</sup> 42.63, 42.48, 43.00, „<sup>14)</sup> 6.44, 6.60, 6.43, Asche 5.78, 3.87, 4.42.

Spezifische Drehung:

ca. 5 Min. nach Auflösung

nach 24 Stdn.

$[\alpha]_D = (+0.96^{\circ} \times 5) : 0.0298 = +161.1^{\circ}$   $(+0.77^{\circ} \times 5) : 0.0298 = +129.2^{\circ}$

„  $(+1.38^{\circ} \times 5) : 0.0433 = +159.3^{\circ}$   $(+1.11^{\circ} \times 5) : 0.0433 = +128.2^{\circ}$

Reduktionsvermögen:

25 mg Sbst. verbrauchten 2.7 ccm  $n_{10}$ - $KMnO_4$ , entsprechend 17.2 mg Cu = 62.1 %  $R_{Maltose}$ . (Reduktionsvermögen nach Ling<sup>13)</sup> = 66 %  $R_{Maltose}$ )

### Acetylierung des Trisaccharids.

5 g des Zuckers wurden mit der zwanzigfachen Menge eines Gemisches gleicher Volumina Essigsäure-anhydrid und Pyridin übergossen und bei  $35^{\circ}$  belassen. In 24 Stdn. war die gesamte Substanz in Lösung gegangen. Die Lösung wurde nun langsam und unter fortwährendem Umrühren in Eiswasser gegossen, wobei das Acetat sofort pulverförmig ausfiel. Es wurde gründlich mit Wasser ausgewaschen, hierauf abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Zur Reinigung des etwas gelbgefärbten Produktes lösten wir in wenig Chloroform und fällten mit Petroläther; der anfangs ölförmige Körper verwandelte sich beim Verreiben mit mehr Petroläther in ein weißes Pulver.

0.1026 g Sbst.: 0.1878 g  $CO_2$ , 0.0491 g  $H_2O$ .

$C_{18}H_{21}O_{16}(CO.CH_3)_{11}$  (966.63). Ber. C 49.68, H 5.63. Gef. C 49.93, H 5.36.

$[\alpha]_D^{22} = (+1.22^{\circ} \times 5) : 0.0505 = +120.8^{\circ}$  (in Chloroform).

Ein anderes Präparat zeigte  $[\alpha]_D = +121.7^{\circ}$ .

### Molekulargewichts-Bestimmung in Benzol:

	K	P	p	$\Delta$	M
I.	1850	8.82 g	0.1522 g	0.102 <sup>0</sup>	863
II.	1850	8.82 „	0.2869 „	0.196 <sup>0</sup>	846

$C_{18}H_{21}O_{16}(CO.CH_3)_{11}$ . Ber. M = 966.63.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft, sowie Hrn. Dr. W. Kusenack, der uns bei einigen Versuchen unterstützte, danken wir für ihre Hilfe.

<sup>14)</sup> bezogen auf die aschefreie Substanz.