

Einfluß von Kupfersulfat auf die Stärkehydrolyse

Photometrische Messung der katalytischen Aktivität der Diastase

Thomas Schröer und Helmut Vogt

Kurzfassung

Die von VOGT & HESSE (1992) beschriebene amyloklastische Methode zur photometrischen Messung des Stärkeabbaues ist weiterentwickelt worden und ermöglicht exakte quantitative Messungen der Diastaseaktivität. Diese Methode beruht auf der Anfärbbarkeit von Stärke mit Lugolscher Lösung. Die Extinktion der so hervorgerufenen Farbintensität einer Iod-Stärke-Lösung kann mit einem Photometer gemessen werden. Der durch Diastase katalysierte Stärkeabbau kann indirekt analysiert werden, da unter bestimmten Bedingungen eine Konzentrationsproportionalität der Extinktion dieser Iod-Stärke-Lösung nachzuweisen ist. Der hemmende Einfluß des Iod-Stärke-Komplexes auf die Diastaseaktivität wird meßtechnisch genutzt.

So konnte der Einfluß von Kupfersulfat auf die katalytische Aktivität der Diastase analysiert werden. Die Messungen zeigen, daß durch Kupfersulfat insgesamt eine Verzögerung der durch Diastase katalysierten Stärkehydrolyse bewirkt wird. Während die Gegenwart von Kupferionen den Abbau der Stärke verzögert, führen die Sulfationen zu einem vollständigen Abbau der Stärke durch Diastase.

1 Einleitung

Die älteste Methode zur Bestimmung der Amylaseaktivität basiert auf der visuellen Beurteilung der Iod-Stärke-Reaktion und wurde von WOHLGEMUTH (1908 a; 1908 b) entwickelt. Seit dieser Zeit sind über 200 quantitative Verfahren (HENKEL, 1982) zur Bestimmung der Amylaseaktivität veröffentlicht worden. Für die Messung der Amylaseaktivität kommen auch heute noch unterschiedliche Methoden zur Anwendung. Es ist jedoch noch keine als Referenz- oder Standardmethode anerkannt worden (GIBITZ, 1982; SCHUMACHER, 1986).

Mit den relativ einfachen Methoden, welche in physiologischen Kursen eingesetzt werden, konnte bisher der Kupfersulfateinfluß auf die Diastaseaktivität nicht geklärt werden.

Deshalb wurde eigens für diese Problemstellung eine modifizierte Vorgehensweise, beruhend auf bestehenden amyloklastischen Methoden, entwickelt.

2 Material und Methode

2.1 Grundlegendes Meßprinzip

Das hierbei verwendete Meßprinzip zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der Diastase beruht auf dem direkten Nachweis von Stärke anhand der Iod-Stärke-Reaktion. Dabei wird nicht - wie vielfach beschrieben (z.B. STRASBURGER, 1991) - Iod als Band innerhalb der Stärkewindung eingelagert, sondern Iod assoziiert den Windungen folgend an der Stärkehelix (THORN & MOHAZZEB, 1990).

Für die Messung der Amylaseaktivität ist die direkte Bestimmung der Abnahme des Substrates (Stärke) mit Hilfe der Iod-Stärke-Reaktion theoretisch und praktisch zuverlässiger als die Messung der Zunahme der Spaltprodukte (Maltose), da bei der Stärkehydrolyse zunächst größere Bruchstücke entstehen und nicht gleich Maltose, was nach RICHTERICH & COLOMBO (1962) zur Folge hat, daß „die Bestimmung der reduzierenden Gruppen etwa 10 bis 100 mal weniger empfindlich ist als die direkte Bestimmung der Abnahme des Substrates“. Auch MARCINIAK & KULA (1982) stellten in einem Methodenvergleich fest, daß „die größte Genauigkeit der Bestimmung der Amylaseaktivität die auf der Messung der Färbung des Iod-Stärke-Komplexes beruhende amyloklastische Methode ist“. Die von VOGT & HESSE (1992) weiterentwickelte amyloklastische Methode hat den Vorteil, daß mit relativ geringem zeitlichem und technischem Aufwand, sowie mit preiswerten Materialien und Geräten, die dynamischen Messungen der Enzymaktivität durchgeführt werden können.

Mit der Hinzugabe von Iod-Kaliumiodid (Lugolsche Lösung) wird die Aktivität der Diastase gestoppt, da der Iod-Stärke-Komplex einen kompetitiven Hemmer dieser stärkehydrolysierenden Enzyme darstellt (VOGT & HESSE, 1992).

Grundsätzlich muß bei der photometrischen Messung der Farbintensität des Iod-Stärke-Komplexes beachtet werden, daß sowohl die Temperatur als auch das Licht auf die Extinktion des Farbkomplexes einen nicht unerheblichen Einfluß haben. Mit abnehmender Temperatur wird die Blaufärbung des Iod-Stärke-Komplexes intensiver (KNUTSON et al., 1982). Da bekanntlich die Temperatur einen Einfluß auf die Enzymaktivität hat, müssen die Messungen bei einer konstanten Temperatur durchgeführt werden.

Die Zubereitung und Aufbewahrung der Lugolschen Lösung und die Messung der Enzymaktivität müssen im Dunkeln erfolgen, da die „Extinktionsleistung“ der Lugolschen Lösung und des Iod-Stärke-Komplexes durch Lichteinwirkung abnimmt (VOGT & HESSE, 1992). Darüber hinaus ist zu beachten, daß das Absorptionsspektrum des Iod-Stärke-Komplexes von der Stärkeart, der Zubereitung der Stärkelösung, von der Kettenlänge der Makromoleküle und dem Amylopektinanteil abhängt (THORN & MOHAZZEB, 1990).

2.2 Material

Die Extinktionsmessungen erfolgten mit einem Digital-Photometer bei 578 nm und mit Präzisions-Rundküvetten der Firma Dr. Bruno Lange (Nr.: LZP028).

- Das Reaktionsgemisch setzte sich aus folgenden Volumina zusammen:
 - 30 ml Stärkelösung
 - 15 ml aqua dest.
 - 10 ml Kupfersulfatlösung (zur Kontrolle des Kupferioneneinflusses: Stattdessen 10 ml Magnesiumsulfatlösung; zur Kontrolle des Sulfationeneinflusses: stattdessen 10 ml aqua dest.)
 - 5 ml Diastaselösung

Die Konzentrationen der eingesetzten Lösungen des Reaktionsgemisches und der Lugolschen Lösung müssen so gewählt werden, daß die Extinktionswerte nicht 1,8 E übersteigen. Oberhalb von 1,8 E steigt die Ungenauigkeit des Meßsystems bedeutend an (KORTÜM, 1962; LANGE, 1985).

- Konzentrationen der Lösungen:
 - 0,05 %ige Stärkelösung (sollte frisch angesetzt werden, da nach wenigen Tagen der Aufbewahrung eine geringfügige Extinktionsabnahme, d.h. eine Hydrolyse der Stärkelösung, meßbar ist [SEIDEMANN, 1979; SCHULMANN & KAMMIOVIRTA, 1991]).
 - 0,1 M Kupfersulfatlösung (Merck Nr. 2790 als Stammlösung zur Herstellung der übrigen Lösungen geringerer Molarität).
 - 0,1 M Magnesiumsulfatlösung (Merck Nr.: 5886).
 - 0,5 %ige Diastaselösung (Fluka Nr.: 33470, - und -Amylasen aus Gerste, Aktivität 2500 U/g; muß täglich frisch angesetzt werden).
 - 300fach verdünnte Lugolsche Lösung (Stammlösung: 10 g Kaliumiodid und 5 g Iod in 100 ml aqua dest).

„Exkurs“: Theoretische Grundlagen zur photometrischen Messung der Extinktion - das Bouguer-Lambert-Beer'sche Gesetz

(KORTÜM, 1962; LANGE et al., 1980; PERKAMPUS, 1993; 1986)

Bezeichnet man die Intensität des in ein absorbierendes Medium eindringenden Lichtes mit I_0 , die Intensität des austretenden Lichtes mit I , so wird der Quotient

$$I / I_0 = \tau(\lambda) \quad (\text{mit } 0 < \tau < 1) \quad (1)$$

als *Transmissionsgrad* definiert. Die Extinktion $E(\lambda)$ ist der reziproke Logarithmus des Transmissionsgrades:

$$E(\lambda) = \log 1 / \tau(\lambda) = \log (I_0 / I) \quad (2)$$

$E(\lambda)$ bezeichnet man als *dekadische Extinktion* bei der Wellenlänge λ [nm]. Der dekadische Logarithmus des reziproken Transmissionsgrades τ ist bei konstanter Wellenlänge λ der Schichtdicke d (das ist die von dem Photometerlicht zu durchdringende Wegstrecke in der Lösung, also der innere Durchmesser der Rundküvette) direkt proportional:

$$E(\lambda) = \log 1 / \tau(\lambda) = m(\lambda) \cdot d \quad (3)$$

$m(\lambda)$ wird als *dekadischer Extinktionsmodul* definiert: Dies ist eine den Stoff charakterisierende Proportionalitätskonstante, die die Dimension einer reziproken Länge hat und in [cm^{-1}] angegeben wird.

Bei verdünnten Lösungen ist das Extinktionsmodul $m(\lambda)$ der Konzentration c der absorbierenden Lösung proportional:

$$m(\lambda) = \epsilon(\lambda) \cdot c \quad (4)$$

$\epsilon(\lambda)$ stellt den *molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten* dar, der nicht mehr von der Konzentration c abhängig ist. (Konzentration c in [$\text{Mol} \cdot \text{l}^{-1}$], Schichtdicke d in [cm] und ϵ in [$\text{Mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]). In der Literatur wird der molare dekadische Extinktionskoeffizient überwiegend als reine Zahlengröße angegeben. Den funktionellen Zusammenhang zwischen $\epsilon(\lambda)$ und der Wellenlänge λ (nm) bezeichnet man als das *Absorptionsspektrum* einer Lösung. Da der Extinktionskoeffizient von der Wellenlänge des absorbierten Lichtes abhängt, ermittelt man das Absorptionsspektrum der jeweiligen Lösung, indem man ϵ als Ordinate gegen die Wellenlänge als Abszisse aufträgt. Bei konstantem Produkt ($c \cdot d$) ist die Extinktion $E(\lambda)$ konstant. Daraus folgt das **Bouguer-Lambert-Beer'sche** Gesetz:

$$E_{(\lambda)} = \epsilon_{(\lambda)} \cdot c \cdot d \quad (5)$$

Da bei den hier beschriebenen photometrischen Messungen mit Küvetten konstanter Schichtdicke d gearbeitet wird und der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{(\lambda)}$ bei monochromatischem Licht (konstante Wellenlänge $\lambda = 578 \text{ nm}$) eine Konstante ist, ist die Extinktion $E_{(\lambda)}$ einer Lösung somit nur ihrer Konzentration c proportional.

Das Bouguer-Lambert-Beer'sche Gesetz setzt also zunächst die Messung des Verhältnisses der Lichtintensitäten I_0 und I voraus. Da bei der Extinktionsmessung ein Teil des Lichtes durch Reflexionen an der Küvettenoberfläche verloren geht, führt man vor jeder Meßreihe eine Vergleichsmessung gegen eine Küvette gleicher Schichtdicke durch, die statt der Meßlösung aqua dest. enthält. Der Betrag des durch die Referenzküvette tretenden Lichtstrahls ist I_0 ; der Betrag des durch die Meßküvette, die die Probe enthält, tretenden Lichtstrahls ist I . Die nun von Reflexionsverlusten unabhängige Extinktion einer Lösung wird im Photometer digital als E angezeigt.

Das Bouguer-Lambert-Beer'sche Gesetz ist ein Grenzgesetz für verdünnte Lösungen. KORTÜM (1962) fordert, die Extinktionsmessungen nur von Lösungen mit einer Konzentration von weniger als $10^{-2} \text{ Mol} \cdot \text{l}^{-1}$ durchzuführen, da der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{(\lambda)}$ bei konzentrierteren Lösungen nicht mehr konstant ist, sondern vom Brechungsindex der Lösung abhängt. Bei entsprechend gering konzentrierten Lösungen ist dieser Effekt zu vernachlässigen; so ist die Meßgenauigkeit bei $0,430 E$ am größten, über $1,8 E$ wird der Meßfehler relativ groß (KORTÜM, 1962; LANGE, 1985).

2.3 Durchführung einer Meßreihe - Arbeitsanleitung

Nach dem Ansetzen der für die Meßreihen benötigten Lösungen und der Kontrolle der äußeren Bedingungen (konstante Raumtemperatur und Raumabdunkelung), wurde mit einer 4 ml aqua dest. enthaltenen Rundküvette jeweils vor Versuchsbeginn im Photometer eine Nullpunktgleichung der Extinktion durchgeführt. Daraufhin konnten die Messungen der Diastaseaktivität nach dem in Abb. 1 dargestellten Schema erfolgen.

Zur Messung der Ausgangsextinktion (Reaktionsgemisch ohne Diastase, also zum Zeitpunkt Null der Diastaseaktivität) wurden $3,67 \text{ ml}$ des Reaktionsgemisches in eine Rundküvette pipettiert. Anschließend wurde in diese Rundküvette statt Diastase $0,33 \text{ ml}$ aqua dest. und fünf Sekunden vor der Extinktionsmessung $0,2 \text{ ml}$ Lugolsche Lösung zugegeben. Die Extinktion der so angefärbten Lösung wurde mit dem Photometer bei 578 nm bestimmt.

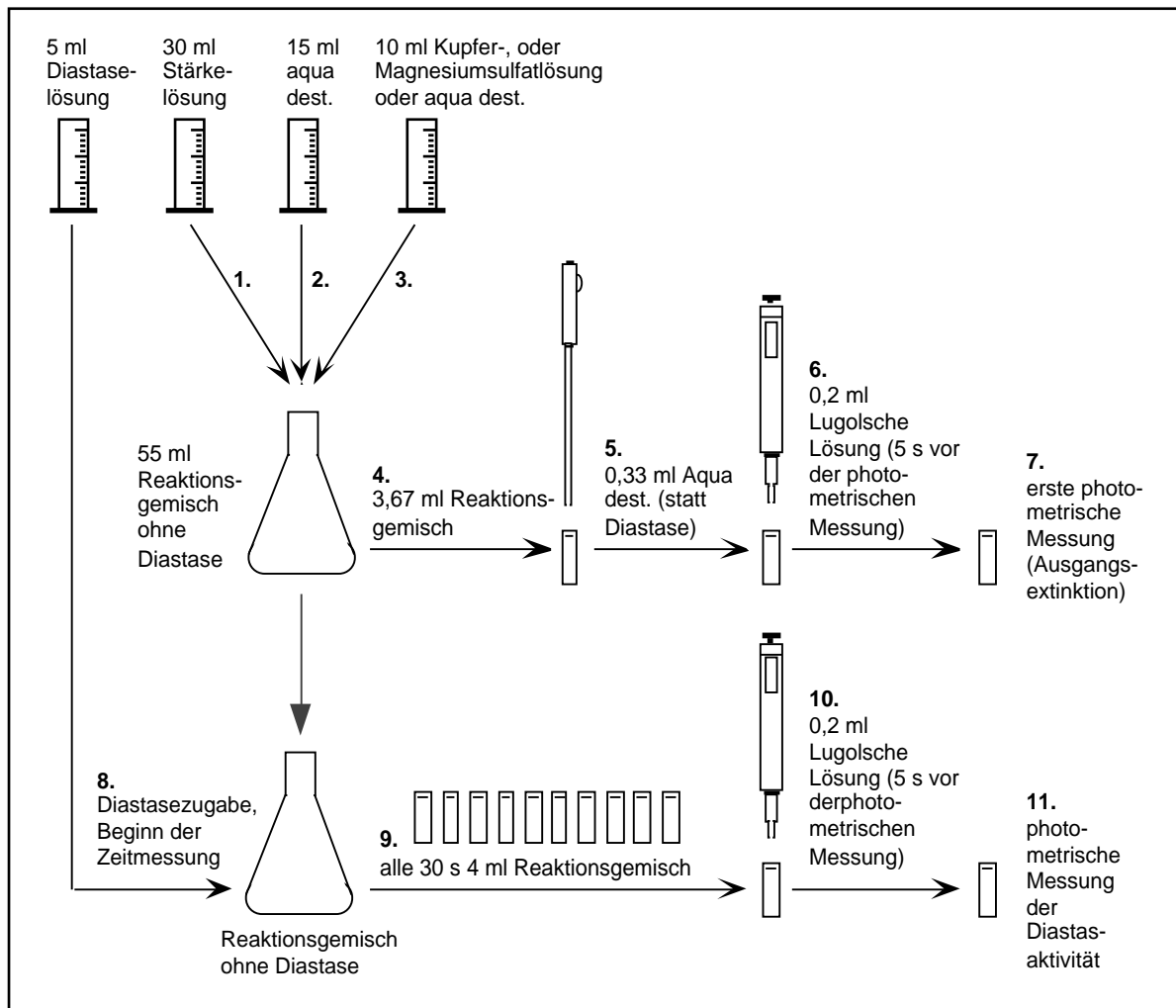


Abb. 1: Verlaufsschema einer Meßreihe.

Anschließend wurden 5 ml Diastaselösung in das verbleibende Reaktionsgemisch pipettiert. Nach leichtem Durchmischen wurden genau 4 ml dieses Reaktionsgemisches in eine weitere Rundküvette pipettiert. Exakt 25 Sekunden nach der Diastasezugabe wurde 0,2 ml Lugolsche Lösung mit der Mikropipette in die Rundküvette gegeben und fünf Sekunden später, also 30 Sekunden nach der Diastasezugabe, die Extinktion des Reaktionsgemisches mit dem Photometer ermittelt. Daraufhin wurde erneut 4 ml des Reaktionsgemisches in eine weitere Rundküvette pipettiert, 55 Sekunden nach der Diastasezugabe mit 0,2 ml Lugolsche Lösung „angefärbt“ und fünf Sekunden später, also 60 Sekunden nach der Enzymzugabe, die Extinktion ermittelt. Dieser Vorgang ist jeweils alle 30 Sekunden wiederholt worden, bis nach sechs Minuten 12 Extinktionsmessungen durchgeführt worden sind.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Ausgangsextinktion in Abhängigkeit von der Stärkekonzentration

Die Abbildung 2 stellt eine Iod-Sättigungskurve dar. Bis zu einer Stärkekonzentration von 0,05 % besteht eine annähernd lineare Beziehung zwischen der Konzentration der Stärkelösung und der (Ausgangs)Extinktion. Die 0,05 %ige Stärkekonzentration bezieht sich auf die dem Reaktionsgemisch hinzupipettierte Stärkelösung und entspricht demnach einer Stärkekonzentration in der Rundküvette von 0,0238 %. Der geringere Anstieg der Extinktionswerte bei einer Stärkekonzentration von über 0,05 % kommt dadurch zustande, daß nicht genügend Iod-Kaliumiodid in dem Reaktionsgemisch vorhanden ist, um die gesamten Stärkeketten komplett „anzufärben“ (VOGT & HESSE, 1992). Sowohl Kupfersulfat, als auch Magnesiumsulfat verursachen gegenüber den mit aqua dest. durchgeführten Messungen eine geringfügige Erhöhung der Ausgangsextinktion. Die Proportionalität der Extinktion zur Konzentration der Iod-Stärkelösung wird jedoch durch die Kupfer- und Magnesiumsulfatlösung nicht wesentlich beeinflusst. Kupfersulfat und Magnesiumsulfat könnten die Assoziation von Iod und Stärke fördern, welches die Erhöhung der Ausgangsextinktion gegenüber Iod-Stärke-

Lösungen ohne Kupfer- und Magnesiumsulfat erklären würde (BHIDE et al., 1981).

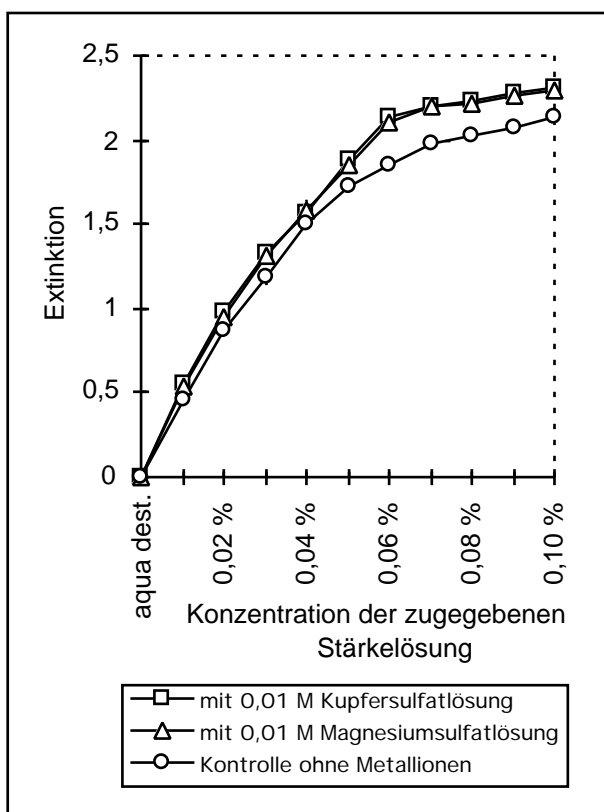


Abb. 2: Einfluß der Konzentration der Stärkelösung auf die Ausgangsextinktion. Gemittelte Werte aus je drei Meßreihen.

3.2 Einfluß von Kupfersulfat auf die katalytische Aktivität der Diastase

Anhand der Messungen (Abb. 2) wird deutlich, daß eine Verringerung der Stärkekonzentration im Reaktionsgemisch, also auch ein enzymatischer Abbau der Stärke, direkt anhand der gemessenen Extinktion nachgewiesen werden kann (vgl. Exkurs). Die Diastaseaktivität läßt sich mittels der in Abb. 3 dargestellten Extinktionsabnahme des Iod-Stärke-Komplexes genauer analysieren.

Vergleicht man die Dynamik der Extinktionsabnahme der mit Kupfersulfat durchgeführten Meßreihen mit den zur Kontrolle mit Magnesiumsulfat durchgeführten Meßreihen, läßt sich feststellen, daß Kupferionen eine Verzögerung der Extinktionsabnahme, also eine Verringerung der katalytischen Aktivität der Diastase, bewirken. Durch Kupfersulfat wird jedoch die Stärkehydrolyse nicht verhindert: Sechs Minuten nach der Diastasezugabe ist keine Stärke mehr nachzuweisen.

Anhand der Kontrollmessungen mit aqua dest. statt Kupfersulfat wird deutlich, daß die Stärkehydrolyse ohne Sulfationen nicht vollständig erfolgt. Die Sulfationen sind demzufolge für die katalytische Aktivität der Diastase von Bedeutung. Im Gegensatz zu den Kupferionen hemmen die Magnesiumionen nicht den Stärkeabbau.

Die Intensität der Verzögerung der Stärkehydrolyse hängt sowohl von der

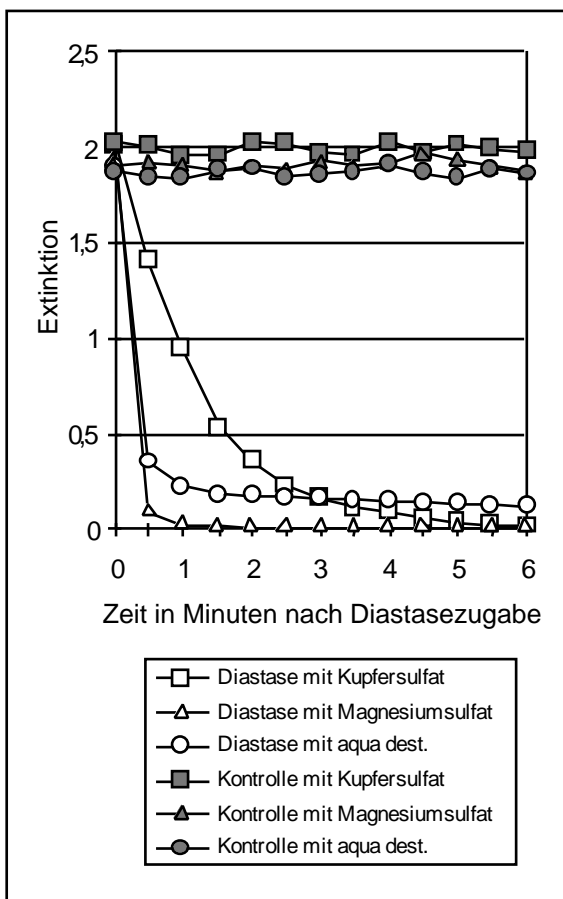


Abb. 3: Einfluß von Kupfersulfat im Vergleich zu Magnesiumsulfat auf die katalytische Aktivität der Diastase; dargestellt als Extinktionsabnahme des Iod-Stärke-Komplexes. (Gemittelte Werte aus je drei Meßreihen; 0,01 M Kupfer- u. Magnesiumsulfatlösungen)

Diastasekonzentration (Abb. 4) als auch von der Kupfersulfatkonzentration (Tab. 1) ab.

Die Extinktion des Reaktionsgemisches ohne Kupfer- bzw. Magnesiumsulfat, also nur mit Stärke- und Diastaselösung, lag bei allen eingesetzten Diastaselösungen nach sechs Minuten (und auch nach 60 Minuten!) mit 0,2 E noch über dem als Reaktionsende definierten (HELD, 1966) Wert von 0,02 E. Je höher die Konzentration der Diastaselösung ist, desto geringer ist die durch Kupfersulfat bewirkte Verzögerung der Stärkehydrolyse und desto schneller erfolgt auch ein vollständiger Abbau der Stärke (vgl. Abb. 4).

Je geringer die Kupfersulfatkonzentration im Reaktionsgemisch ist, desto geringer ist auch die Verzögerung zu Beginn der Stärkehydrolyse, da der hemmende Einfluß der Kupferionen schwächer ist. Allerdings nimmt bei einer Verringerung der

Kupfersulfatkonzentration die Dauer bis zum vollständigen Abbau der Stärke zu, da auch der fördernde Einfluß der Sulfationen auf die Enzymaktivität geringer ist (Tab. 1).

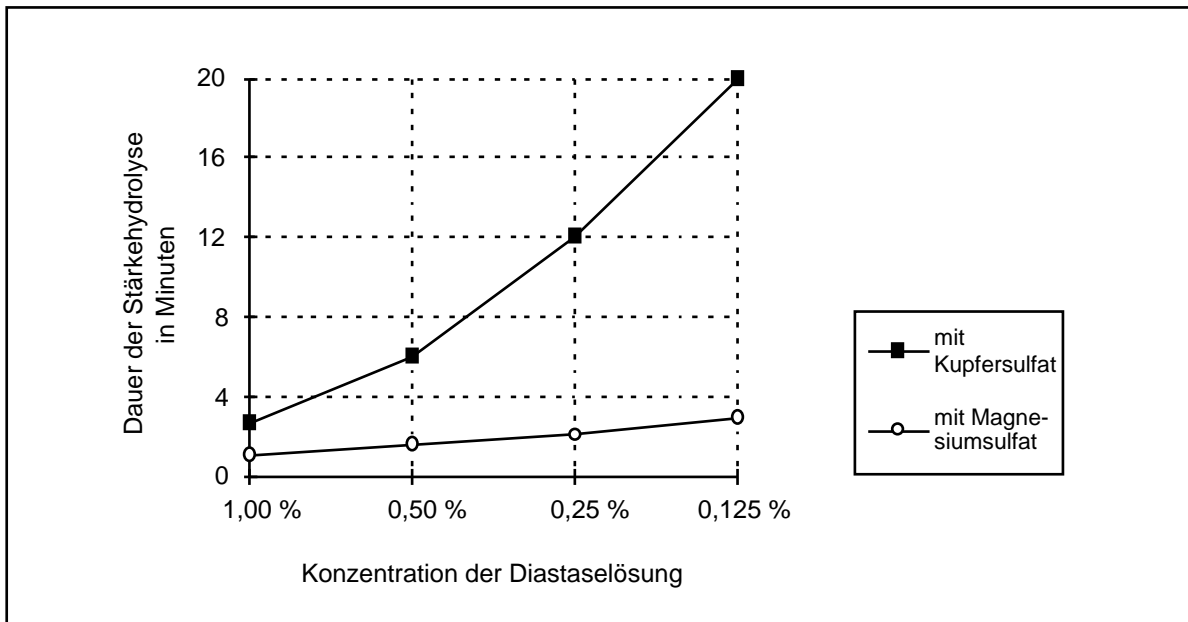


Abb. 4: Dauer der Stärkehydrolyse in Abhängigkeit von der Diastasekonzentration unter Einwirkung von Kupfer- bzw. Magnesiumsulfat. Gemittelte Werte aus je drei Meßreihen.

Tab. 1: Beeinflussung der Diastaseaktivität durch unterschiedliche Kupfersulfatkonzentrationen.

Konzentration der hinzugegebenen Kupfersulfatlösung [M]	Extinktionsabnahme innerhalb der ersten 30 s nach der Diastasezugabe [E]	Dauer ¹ der Stärkehydrolyse ² [Minuten]
0,1	0,53	6
0,01	0,597	6
0,001	0,868	15
0,0001	1,258	20
aqua dest.	1,382	-

¹Durchschnittswerte aus je drei Meßreihen.

²Die Stärkehydrolyse wird bei einer Extinktion von weniger als 0,02 E als beendet angesehen (HELD, 1966).

Es liegt die Vermutung nahe, daß die Kupferionen eine chemische Blockierung der reaktiven SH-Gruppen im aktiven Zentrum des Enzyms bewirken und diese weniger spezifischen Inhibitoren die für die Enzymaktivität essentiellen Metalle blockieren (KARLSON et al., 1994; SCHELLENBERGER et al., 1989). Bei Untersuchungen über die Reaktionsbedingungen der α -Amylase in vitro wurde festgestellt, daß das Metalloenzym Chloridionen und Calciumionen für die Aktivierung benötigt (HSIU et al., 1964; BERGMAYER & GRASSEL, 1983). Diese Ionen sind sehr stark an das Enzym gebunden und können im Falle eines Mangels auch aus den Reagenzien bzw. dem Glasmaterial entzogen und an das Enzym angelagert (HENKEL, 1982)

oder durch Magnesiumionen bzw. auch durch Sr^{2+} , Ba^{2+} und Be^{2+} ersetzt werden (HSIU et al., 1964; SOGAARD et al., 1993).

Anmerkung

Die vorgestellte Methodik führt aufgrund der meßtechnisch schwierigen Handhabung nur bei geübten Personen und unter sorgfältiger Einhaltung der Versuchsbedingungen zu reproduzierbaren Ergebnissen. Dennoch eignen sich solche Messungen für die Durchführung im universitären Bereich sowie in vereinfachter Form in der Sekundarstufe II zur Bearbeitung enzymkinetischer Fragestellungen.

Zitierte Literatur

- BERGMEYER, H.U. & M. GRABL (1983): *Methods of enzymatic analysis*. 3. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim Basel.
- BHIDE, S.V., M.S. KARVE & N.R. KALE (1981): The interaction of sodium dedecyl sulfate, a competing ligand, with iodine complexes of amylose and amylopectin. In: BRANT, D.A. [Ed.]: *Solution properties of polysaccharides*. ACS Symposium Series **150**, 491-511.
- GIBITZ, H.J. (1982): α -Amylase - Übersicht und Methodenvergleich. Deutsche Gesellschaft f. Klinische Chemie e.V.- Mitteilungen **5**, 162-171.
- HELD, H. (1966): Vergleichende Untersuchung über die Anfärbbarkeit und das Reduktionsvermögen von Stärkespaltprodukten nach α - und β -Amylolyse. Dissertation der tierärztlichen Fakultät München.
- HENKEL, E. (1982): Methodische Untersuchungen zur Bestimmung der α -Amylaseaktivität mit Oligosacchariden als Substrat. Habilitationsschrift, Medizinische Hochschule Hannover.
- HSIU, J., E. FISCHER & A. STEIN (1964): α -Amylase as calcium-metalloenzymes. II. Calcium and the catalytic activity. *Biochemistry* **3**, 61-66.
- KORTÜM, G. (1962): *Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie*. Springer, Berlin Göttingen Heidelberg.
- KRAVE, M.S. & N.R. KALE (1992): A spectrophotometric method for the determination of iodine binding capacity for starch and its components. *Starch / Stärke* **44** (1), 19-21.
- LANGE, B., J.J. VEJDECEK & Z. DENEK (1980): *Photometrische Analyse*. Verlag Chemie, Weinheim.
- LANGE, B. [Hrsg.] (1985): *Handbuch zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung*. Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin.
- MARCINIAK, G.P. & M.-R. KULA (1982): Vergleichende Untersuchung der Methoden zur Bestimmung der Aktivität bakterieller α -Amylasen. *Starch / Stärke* **34**, 422-430.
- PERKAMPUS, H.-H. (1986): *UV-VIS-Spektroskopie und ihre Anwendungen. Anleitungen für die chemische Laboratoriumspraxis*; Bd. 21. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- PERKAMPUS, H.-H. (1993): *Lexikon der Spektroskopie*. VCH, Weinheim New York Basel Cambridge.
- RICHTERICH, R. & J.P. COLOMBO (1962): Ultramikro-Methoden im klinischen Laboratorium. I. α -Amylase (Diastase). *Das Ärztliche Laboratorium* **8**, 33-44.
- SCHELLENBERGER, A., G. FISCHER, G. HÜBNER & R. ULBRICH (1989): *Enzymkatalyse: Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme*. Gustav Fischer, Jena.
- SCHULMAN, A.H. & K. KAMMIOVIRTA (1991): Purification of barley starch by protein extraction. *Starch / Stärke* **43** (10), 387-389.
- SCHUMACHER, G. (1986): Vergleichende Bewertung der neueren Verfahren zur Aktivitätsbestimmung der α -Amylase unter besonderer Berücksichtigung der Isoenzymzusammensetzung der Proben. Dissertation, Universität Köln.

- SEIDEMANN, J. (1979): Charakterisierung von löslicher Stärke und anderer Stärkepolysaccharide zur Bestimmung der α -Amylaseaktivität. *Pharmazie* **34** (2), 79-85.
- SOGAARD, M., J.-I. ABE, M. MARTIN-EUCLAIRE & B. SVENSON (1993): α -Amylases: Structure and funktion. *Carbohydr. Polym.* **21**, 137-146.
- THORN, W. & S. MOHAZZEB (1990): α -D-Polyglucane-Iodine Complexes. *Starch / Stärke* **42**, 455-459.
- VOGT, H. & M. HESSE (1992): Stärkeabbau im Photometer - Experimente für den Biologieunterricht. *MNU* **45** (2), 76-81.
- WOHLGEMUTH, J. (1908 a): Über neue Methoden zur Bestimmung des diastatischen Fermentes. *Biochemische Zeitschrift* **9**, 1-9.
- WOHLGEMUTH, J. (1908 b): Untersuchungen über die Diastasen. *Biochemische Zeitschrift* **9**, 10-34.

Verfasser: Dr. Helmut Vogt und Thomas Schröer, Institut für Didaktik der Biologie der Westfälischen Wilhelms-Universität, Fliegerstr. 21, 48149 Münster.