

## (1→4)- $\alpha$ -D-GLUCOPYRANOSYLTRANSFER-PRODUKTE AUS CYCLOHEXAAMYLOSE\*

HANS BENDER

Chemisches Laboratorium der Universität, Albertstr. 21, D-7800 Freiburg i. Br.  
(Bundesrepublik Deutschland)

(Eingegangen am 13. April 1977; angenommen in revidierter Form am 9. Juni 1977)

### ABSTRACT

At sufficiently high concentrations of the substrate cyclohexaamylose and low concentrations of the acceptors maltose or D-glucose, the cyclodextrin glycosyltransferase (EC 2.4.1.19) from *Klebsiella pneumoniae* M 5 al catalyses (1→4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-transfer reactions giving amylose-like (1→4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl chains ( $\overline{d.p.}$  45) up to 28.7% of the total carbohydrate content. Increase of the acceptor concentration reduces the proportion of the longer chains and the average chain-length. The proportions of cyclooctaamylose, of cyclohexaamylose, and of maltooligosaccharides depend on the acceptor concentration. Significantly larger proportions of the longer chains, and of cycloheptaamylose are formed with the acceptor maltose. Even at equimolar concentrations of substrate and acceptor, larger proportions of (1→4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl chains ( $\overline{d.p.}$  16) are formed in the early phase of the transfer reaction, 2.6 times as much with maltose as with D-glucose. Correspondingly, much more cycloheptaamylose is present if the initial acceptor is maltose. The relationship between the D-glucopyranosyl chains of  $\overline{d.p.}$  16 and the formation of cycloheptaamylose, and between the chains of  $\overline{d.p.}$  > 20 and the formation of cyclooctaamylose is discussed.

### ZUSAMMENFASSUNG

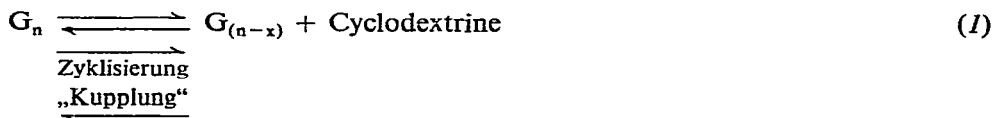
Die Cyclodextrin-Glycosyltransferase von *Klebsiella pneumoniae* M 5 al katalysiert bei genügend hoher Anfangskonzentration des Substrates Cyclohexaamylose und niederen Konzentrationen der Akzeptoren D-Glucose oder Maltose Transferreaktionen, bei denen bis zu 28,7% des Gesamtkohlenhydrats an längeren, amylose-ähnlichen (1→4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylketten erhalten werden. Mit steigender Akzeptorkonzentration nimmt sowohl deren Gesamtmenge wie auch der durchschnittliche Polymerisationsgrad ab. Von der Akzeptorkonzentration abhängig sind auch die gebildeten Mengen an Cyclooctaamylose, an Cyclohexaamylose und an Maltooligosacchariden. Signifikant grössere Mengen an den längeren (1→4)- $\alpha$ -D-

\*Teil 3. Cyclodextrin-Glycosyltransferase von *Klebsiella pneumoniae* M 5 al.

Glucopyranosylketten und an Cycloheptaamylose (bei höheren Akzeptorkonzentrationen) werden mit dem Akzeptor Maltose gebildet. Auch bei äquimolaren Konzentrationen von Substrat und Akzeptor sind in der Anfangsphase der Transferreaktion grössere Mengen an (1→4)-α-D-Glucanopyranosylketten ( $\bar{P}_n$  16) nachzuweisen. Mit dem Akzeptor Maltose werden 2,6 mal mehr an diesen D-Glucopyranosylketten produziert als mit D-Glucose. Im Verlauf der weiteren Inkubation nimmt der Gehalt an Cycloheptaamylose in den Transferansätzen mit dem Initial-Akzeptor Maltose in weit stärkerem Masse zu. Die Zusammenhänge zwischen den (1→4)-α-D-Glucopyranosylketten mit  $\bar{P}_n$  16 und der Bildung von Cycloheptaamylose sowie zwischen D-Glucopyranosylketten  $>Glc_{20}$  und der Bildung von Cyclooctaamylose werden diskutiert.

#### EINLEITUNG

Charakteristische Eigenschaft der Cyclodextrin-Glycosyltransferasen\* ist die Katalyse der reversiblen Reaktion\*\* 1. Daneben katalysiert das Enzym wie beispiels-



(x = 6 Cyclohexa-, x = 7 Cyclohepta-, x = 8 Cyclooctaamylose)

weise die recht gut untersuchte Amylomaltase von *Escherichia coli*<sup>1-3</sup> durch (1→4)-α-D-Glucopyranosyl-transfer die Disproportionierung linearer Maltooligosaccharide<sup>4-6</sup> (2). *Bacillus macerans* war über mehr als 70 Jahre der einzige Mikro-



organismus, von dem die Produktion einer CGT („*Bacillus macerans*-Amylase, BMA“) bekannt war (zur Übersicht, siehe Zit. 4,7). Mit der Isolierung dreier weiterer, CGT-produzierender Mikroorganismen (*Bacillus megaterium*<sup>8,9</sup>, einem alkalophilen *Bacillus*<sup>10,11</sup> und einem Stamm von *Klebsiella pneumoniae*<sup>12</sup>) in den vergangenen drei Jahren wurden den Untersuchungen an dieser Enzymgruppe neue Impulse gegeben.

Bei der Spaltung von Stärken, ihrer Komponenten Amylose und Amylopektin bzw. bei der Spaltung von Glykogen durch die CGT nach (1) werden Cyclodextrine in Ausbeuten bis zu 80 % der vorgelegten D-Glucane gebildet. Die Gesamtmenge an diesen zyklischen Produkten sowie die Teilmengen an den hauptsächlich produzierten unverzweigten Cyclohexa-, Cyclohepta- und Cyclooctaamylosen sind sowohl von den verwendeten D-Glucanen wie auch von den bei der Spaltung gewählten Bedingungen abhängig<sup>4,13,14</sup>, (siehe dazu jedoch Zit. 8,15).

Wie die Bildung der Cyclodextrine aus den D-Glucanen war die rückläufige

\*Cyclodextrin-Glycosyltransferase oder (1→4)-α-D-glucan:[(1→4)-α-D-glucopyranosyl]transferase (cyclizing) (EC 2.4.1.19); Abkürz. CGT.

\*\*Abkürz.  $G_n$ , (1→4)-α-D-Glucopyranosylkette mit n D-Glucopyranosylresten.

Reaktion, Transfer der zyklischen Komponenten auf geeignete Akzeptoren [„Kupplungsreaktion“ (1)] unter Bildung linearer Maltooligosaccharide und deren Disproportionierung [„Homologisierungsreaktion“ (2)] Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (zur Übersicht siehe Zit. 4). Hauptsächliche Produkte dieser Reaktionen beispielsweise mit dem Substrat Cyclohexaamylose und den Akzeptoren D-Glucose oder kürzeren Maltooligosacchariden sind (1→4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylketten mit Längen bis zu Glc<sub>10</sub>, neben diesen konnten geringe Mengen an Cycloheptaamylose nachgewiesen werden<sup>4,5,16–18</sup>.

Trotz zahlreicher, vor allem mit der CGT von *Bacillus macerans* durchgeführter Untersuchungen bleiben eine ganze Reihe grundlegender Fragen offen. Es wurde beispielsweise wohl vermutet, dass bei den D-Glucopyranosyltransfer-Reaktionen von Cyclodextrinen auf geeignete Akzeptoren längere, Amylose-ähnliche (1→4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylketten („Iodfarbe blau“) entstehen können<sup>6</sup>, systematische Untersuchungen zu dieser Frage stehen indessen aus. Bei der „Kupplungsreaktion“ wird von „guten“ und „schlechten“ Akzeptoren gesprochen. Gemeint ist, mit welcher Geschwindigkeit der Transfer der zyklischen Komponenten unter Linearisierung auf die Akzeptoren erfolgt. Der Einfluss eines Akzeptors auf die entstehenden Produkte wurde bislang nicht geprüft. Unsere Untersuchungen hatten zum Ziel, die Transferprodukte mit dem Substrat Cyclohexaamylose und den Akzeptoren Glucose und Maltose systematisch zu erfassen. Die CGT von *Klebsiella pneumoniae* eignet sich dafür deshalb besonders, weil dieses Bakterium im Gegensatz zu *Bacillus macerans* generell keine  $\alpha$ -Amylasen produziert<sup>19</sup>.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

*Material.* — Cyclodextrin-Glycosyltransferase wurde aus dem Kulturfiltrat von *Klebsiella pneumoniae* M 5 al nach beschriebener Methode isoliert und bis zur elektrophoretischen Einheitlichkeit gereinigt<sup>12,19</sup>. Die Maltodextrin-Phosphorylase\* von *Klebsiella pneumoniae* M 5 al wurde nach Vorschrift isoliert und gereinigt<sup>20,21</sup>.

D-Glucose und Maltose für biochemische Zwecke wurden von E. Merck AG, Darmstadt, B.R.D. bezogen, Maltotriose wurde aus Pullulan mit Pullulanase dargestellt<sup>22</sup>. Cyclohexa- und Cycloheptaamylose wurden mit der CGT von *Klebsiella pneumoniae* M 5 al aus Kartoffelstärke (Henkel & Cie, Düsseldorf, B.R.D.) gewonnen und im wesentlichen nach Cramer<sup>17</sup> gereinigt. Alle anderen Substanzen wurden in handelsüblicher, falls erforderlich, in reinster Form verwendet.

*Analytische Methoden.* — Die Freisetzung von D-Glucose durch Disproportionierung der Substrate Maltose und Maltotriose mit der CGT wurde im gekoppelten enzymatischen Test verfolgt<sup>19</sup>. Die Geschwindigkeit der Bildung linearer Phosphorylase-Substrate durch Transfer von Cyclohexa- bzw. Cycloheptaamylose auf die Akzeptoren D-Glucose, Maltose und Maltotriose wurde in dem System CGT plus Maltodextrin-Phosphorylase bestimmt. Das bei der Phosphorylase der linearen

\* (1→4)- $\alpha$ -D-Glucan:orthophosphate glucosyltransferase (EC 2.4.1.1).

D-Glucoseketten entstehende D-Glucopyranosylphosphat wurde im gekoppelten enzymatischen Test nachgewiesen<sup>19</sup>.

Papierchromatographie wurde auf Whatman Nr. 1 in Butanol-Pyridin-Wasser (3:2:2, v/v), zweimal aufsteigend bei 85° zur Trennung der Cyclodextrine<sup>23</sup> und Wasser-Äthanol-Nitromethan (5:8:7, v/v), dreimal absteigend bei 25° zur Trennung der Maltooligosaccharide<sup>24</sup> durchgeführt. Die getrockneten Chromatogramme wurden mit der Eintauchmethode nach Trevelyan *et al.*<sup>25</sup> (AgNO<sub>3</sub> in Aceton, methanolische NaOH) bzw. im Fall der Cyclodextrine durch Eintauchen der Chromatogramme in sehr verdünnte I<sub>2</sub>-KI in Methanol<sup>23</sup> entwickelt.

Kohlenhydrate wurden mit Anthron<sup>26,27</sup> und reduzierende Aldehydgruppen mit dem Nelson-Reagens<sup>28</sup> bestimmt. Die  $\bar{P}_n^*$ -Werte der linearen (1→4)-α-D-Glucopyranosylketten wurden orientierend nach Gesamtkohlenhydrat (als D-Glucose)/reduzierende Glucoseenden bestimmt.

*Durchführung und Aufarbeitung der Transferansätze.* — Eine 60mm Lösung des Cyclohexaamylose Substrats wurde in dest. Wasser durch Erwärmen bereitet und mit verdünntem Citratpuffer, pH 6,4 (5mm an CaCl<sub>2</sub>), auf eine Pufferkonzentration von 10mm und eine Substratkonzentration von 44mm gebracht. Nach Abkühlung wurde CGT (Mol. Gew. 68,000,  $12 \times 10^{-5}$  mol/mol Substrat) zugefügt. Aliquote der Lösung wurden in 500 ml-Erlenmeyerkolben verteilt, in welche die entsprechenden Mengen an der Akzeptoren D-Glucose bzw. Maltose (0,7–44mm) eingewogen waren, und auf 200 ml gebracht wurden. Die Ansätze wurden nach Zugabe von Toluol (3 ml) bzw. ohne Toluol bei 30° unter langsamen Rühren bis zu 96 h inkubiert. Für die Versuchsreihen mit geringerer Substratkonzentration bei gleichem Verhältnis CGT:Substrat:Akzeptor wurde mit 10mm Citratpuffer, pH 6,4 (2mm an CaCl<sub>2</sub>), entsprechend verdünnt. Nach beendeter Inkubation wurde das Enzym durch Erhitzen inaktiviert, die Transferansätze wurden wie folgt aufgearbeitet:

(a) *Methanol-Präzipitation der (1→4)-α-D-Glucopyranosylketten > Glc<sub>12</sub>.* Die Ansätze wurden mit Methanol (1,5 Vol.) versetzt, die Präzipitate nach 24 h Stehen der Fällungen bei 0° durch Zentrifugation abgetrennt, einmal mit Methanol umgefällt und lyophilisiert.

(b) *Cycloheptaamylose.* Die vereinigten Überstände aus (a) wurden auf ein Volumen von 50 ml eingengt. Die auskristallisierte Cycloheptaamylose wurde abgetrennt, einmal als Toluol-Clathrat umgefällt und zusammen mit der Cycloheptaamylose aus (c) lyophilisiert.

(c) *Cyclooctaamylose.* Die vereinigten Überstände aus (b) wurden auf eine Konzentration von 22mm an Cyclohexaamylose verdünnt und mit Brombenzol (3 ml) versetzt. Die unlöslichen Einschlusskomplexe wurden abzentrifugiert und in Wasser zu 30% Gesamtkohlenhydrat durch Abdampfen des Brombenzols gelöst. Die auskristallisierte Cycloheptaamylose wurde mit jener aus (b) vereinigt. Aus dem Überstand wurde die Cyclooctaamylose durch Zugabe von Propanol (1,5 Vol.) auskristallisiert und lyophilisiert.

\*Abkürz.:  $\bar{P}_n$ , durchschnittlicher Polymerisationsgrad.

(d) *Cyclohexaamylose*. Aus den Brombenzol-Überständen wurde die Cyclohexaamylose durch Zugabe von 1,1,1-Trichloroethan (5 ml) präzipitiert, einmal umgefällt und lyophilisiert.

(e) *Maltooligosaccharide*. Die vereinigten Überstände aus (d) wurden lyophilisiert.

Die Ausbeuten an den einzelnen Komponenten wurden sowohl gravimetrisch (auf die Puffersalze korrigiert) wie auch colorimetrisch mit Anthron bestimmt. Die retrogradierte Fraktion des Methanol-Präzipitats wurde 10%ig in Dimethylsulfoxid gelöst und für die analytischen Untersuchungen mit Wasser entsprechend verdünnt. Die molare Konzentration der linearen (1→4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylketten wurde anhand der ermittelten  $\bar{P}_n$ -Werte bestimmt. Bei der Berechnung der molaren Konzentration der Cyclodextrine wurde der in der Literatur angegebene Kristallwassergehalt<sup>29</sup> zugrunde gelegt. Die erhaltenen Cyclodextrinfraktionen waren chromatographisch zu >90% rein.

#### ERGEBNISSE

*Wahl der Akzeptoren und „Akzeptor-Qualität“.* — Für die Untersuchungen sollten Akzeptoren verwendet werden, die selbst keine bzw. sehr schlechte Substrate für die CGT von *Klebsiella pneumoniae* sind. Gemessen an der durch die Disproportionierung der Substrate erfolgende D-Glucose-Freisetzung ist Maltose im Gegensatz zu Maltotriose und höheren Maltooligosacchariden ein ausgesprochen schlechtes Substrat: Mit Maltose werden 6 nmol D-Glucose/mg Protein  $\times$  min, mit Maltotriose dagegen 151 nmol D-Glucose/mg Protein  $\times$  min freigesetzt<sup>19</sup>.

Die „Qualität“ von D-Glucose und Maltose als Akzeptor für die „Kupplungsreaktion“ mit dem Substrat Cyclohexaamylose wird anhand der Bildungsgeschwindigkeit linearer Phosphorylase-Substrate bestimmt (Im Testsystem: 0,15 E/ml Maltodextrin-Phosphorylase, 0,26 E/ml CGT, Substratkonzentration 1mM und Akzeptorkonzentration 0,4mM). Mit D-Glucose als Akzeptor werden 30 nmol D-Glucopyranosylphosphat/ml  $\times$  min (3 min Lag-Phase), mit Maltose 36,4 nmol D-Glucopyranosylphosphat/ml  $\times$  min (2 min Lag-Phase) freigesetzt. Maltose ist demnach der etwas „bessere“ Akzeptor für die Transferreaktion.

Signifikante Unterschiede zwischen beiden Akzeptoren zeigen sich, wenn der Transfer von Cyclohexaamylose auf D-Glucose bzw. Maltose in Gegenwart von Cycloheptaamylose erfolgt. In einem Testsystem, welches neben Cyclohexaamylose und den Akzeptoren noch 0,4mM Cycloheptaamylose enthält, werden mit D-Glucose nur mehr 17 nmol D-Glucopyranosylphosphat/ml  $\times$  min (4 min Lag-Phase), mit Maltose dagegen 30 nmol D-Glucopyranosylphosphat/ml  $\times$  min (3 min Lag-Phase) freigesetzt. Noch gravierender wird der Unterschied, wenn die CGT in Gegenwart von Cycloheptaamylose ohne das Substrat Cyclohexaamylose 15 min vorinkubiert wird: Nach Substratzugabe sind mit dem Akzeptor D-Glucose 9 nmol D-Glucopyranosylphosphat/ml  $\times$  min (6 min Lag-Phase), mit Maltose 26 nmol D-Glucopyranosylphosphat/ml  $\times$  min (3 min Lag-Phase) zu bestimmen.

Cycloheptaamylose selbst ist für die *Klebsiella*-CGT ein schlechtes Substrat, wobei Maltose nun wirklich ein „besserer“ Akzeptor ist: Mit D-Glucose werden 0,5 nmol D-Glucopyranosylphosphat/ml  $\times$  min, mit Maltose 1,3 nmol D-Glucopyranosylphosphat/ml  $\times$  min freigesetzt.

Vergleichsweise seien die erhaltenen Werte mit dem Akzeptor Maltotriose angegeben: Bei dem Transfer von Cyclohexaamylose auf diesen Zucker sind 20 nmol D-Glucopyranosylphosphat/ml  $\times$  min, in Gegenwart von Cycloheptaamylose 23 nmol D-Glucopyranosylphosphat/ml  $\times$  min zu bestimmen. Nach Vorinkubation der CGT mit Cycloheptaamylose ohne das Substrat Cyclohexaamylose werden nach Substratzugabe nur 8 nmol D-Glucopyranosylphosphat/ml  $\times$  min freigesetzt („Glucoseeffekt“ durch Disproportionierung des Akzeptors Maltotriose). Insgesamt scheint Maltotriose „schlechtere“ Akzeptoreigenschaften zu haben als D-Glucose oder Maltose.

*Charakterisierung der aus dem Substrat Cyclohexaamylose und den Akzeptoren Maltose und D-Glucose gebildeten Transferprodukte. — Zusammensetzung der Transferprodukte in Abhängigkeit von der Akzeptorkonzentration.* Die aus Cyclohexaamylose (44mM) in Abhängigkeit von der Akzeptorkonzentration nach 48 h Inkubation in Gegenwart von Toluol erhaltenen Transferprodukte sind in Tab. I und II zusammengestellt: Mit steigender Akzeptorkonzentration nehmen die Mengen an Methanol-präzipitierbarem Material, an Cyclooctaamylose und an Cyclohexaamylose ab, diejenigen an Maltosacchariden zu. Der Gehalt an Cycloheptaamylose steigt mit höherer Akzeptorkonzentration leicht und pegelt sich auf einen etwa konstanten Wert ein. Mit dem Akzeptor Maltose ändert sich die Gesamtmenge an Cyclodextrinen nur geringfügig, die Gesamtmenge an (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylketten (plus D-Glucose) nimmt linear mit der steigenden Akzeptorkonzentration zu. Die Mengen an

TABELLE I

ABHÄNGIGKEIT DER PRODUKTZUSAMMENSETZUNG VON DER KONZENTRATION DES AKZEPTORS MALTOSE<sup>a</sup>

Produkt	Akzeptorkonzentration (mM)					
	0,7	1,4	5,5	11	22	44
Methanol-Präzipitat	26,6 (1,8)	28,4 (2,0)	18 (1,65)	8,6 (1,1)	4,8 (0,7)	1,9 (0,4)
Cyclohexaamylose	25,9 (10)	25,6 (10)	24,2 (9,25)	20,5 (8)	19,2 (7,5)	13,3 (6,6)
Cycloheptaamylose	16,9 (5,5)	16,5 (5,5)	24,7 (7,85)	27,6 (8,95)	23 (7,5)	23,6 (9,7)
Cyclooctaamylose	15,1 (4,25)	13,1 (3,7)	11,7 (3,2)	11,1 (3,05)	8,2 (2,3)	2,8 (1)
Maltooligosaccharide	15,5 (8)	16,4 (8,65)	21,4 (12)	32,2 (18,5)	44,8 (29)	58,4 (47,5)

<sup>a</sup>Substratkonzentration 44mM,  $12 \times 10^{-6}$  mol Enzym/mol Substrat, 48 h Inkubation bei 30° in Gegenwart von Toluol. Für die Aufarbeitung, siehe Material und Methoden. Angaben in % des Gesamtkohlenhydrats, in Klammern molare Konzentration (mM).

TABELLE II

ABHÄNGIGKEIT DER PRODUKTZUSAMMENSETZUNG VON DER KONZENTRATION DES AKZEPTORS D-GLUCOSE<sup>a</sup>

Produkt	Akzeptorkonzentration (mM)					
	0,7	1,4	5,5	11	22	44
Methanol-Präzipitat	18,4 (1,6)	19,2 (1,7)	11,3 (1,45)	6,5 (1,1)	3,6 (0,65)	1,2 (0,25)
Cyclohexaamylose	39 (16,25)	34,3 (13)	29 (11)	24,4 (9,5)	22,5 (8,9)	14,4 (5,65)
Cycloheptaamylose	15,6 (5,5)	16,5 (5,2)	19,5 (6,25)	21,6 (7)	17,9 (6)	17,4 (5,75)
Cyclooctaamylose	15,7 (4,65)	12,3 (3,3)	11,2 (3)	10,3 (2,85)	7,5 (2,1)	1,8 (0,5)
Maltooligosaccharide	11,3 (6,25)	17,7 (8)	28,5 (15,75)	37,2 (21,25)	48,5 (31,6)	65,2 (43)

<sup>a</sup>Substratkonzentration 44mM,  $12 \times 10^{-6}$  mol Enzym/mol Substrat, 48 h Inkubation bei 30° in Gegenwart von Toluol. Für die Aufarbeitung, siehe Material und Methoden. Angaben in % des Gesamtkohlenhydrats, in Klammern molare Konzentration (mM).

TABELLE III

METHANOL-PRÄZIPITIERBARE (1→4)- $\alpha$ -D-GLUCOPYRANOSYLKETTEN DER TRANSFERANSÄTZE MIT DEN AKZEPTOREN MALTOSE UND D-GLUCOSE, RETROGRADIERTE UND LÖSLICHE ANTEILE IN ABHÄNGIGKEIT DER AKZEPTORKONZENTRATION<sup>a</sup>

Akzeptor	Akzeptorkonz. (mM)	(1→4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylketten	
		Retrogradiert <sup>b</sup>	Löslich
Maltose	0,7	60 (44, 590 nm)	40 (29, 580 nm)
	1,4	54 (44,5, 591 nm)	46 (28,5, 580 nm)
	5,5	23 (38, 585 nm)	77 (24, 578 nm)
	11	3,5 (24, 577 nm)	96,5 (20, purpur)
	22	1,9 (20, purpur)	98,1 (18, purpur)
	44		100 (16, purpur)
D-Glucose	0,7	42,7 (43, 589 nm)	57,3 (24, 578 nm)
	1,4	38,5 (42, 589 nm)	61,5 (19, 570 nm)
	5,5	14,3 (33, 582 nm)	85,7 (17, 568 nm)
	11	3 (18, purpur)	97 (15, rot)
	22	1,7 (16, purpurrot)	98,3 (14, rot)
	44		100 (12, braunrot)

<sup>a</sup>Substratkonzentration 44mM,  $12 \times 10^{-6}$  mol Enzym/mol Substrat, 48 h Inkubation bei 30° in Gegenwart von Toluol. Für die Aufarbeitung, siehe Material und Methoden. Angaben in % des Gesamtpräzipitats. In Klammern ermittelte  $P_n$ -Werte und die Absorptionsmaxima der Iodkomplexe.

<sup>b</sup>In Dimethylsulfoxid gelöst.

TABELLE IV

ABHÄNGIGKEIT DER PRODUKTZUSAMMENSETZUNG DER ÄQUIMOLAREN KONZENTRATIONEN VON SUBSTRAT UND AKZEPTOR VON DER INKUBATIONSDAUER UND DER ANWESENHEIT BZW. ABWESENHEIT VON TOLUOL<sup>a</sup>

Akzeptor	Produkt	Inkubationsdauer (h)		
		6	96	
			Ohne Toluol	Mit Toluol
Maltose	Methanol-Präzipitat	18,7 (4,25)	4,7 (1,15)	0,4 (0,1)
D-Glucose		7,3 (1,6)	3,3 (0,9)	
Maltose	Cyclohexaamylose	19,9 (11)	16 (8,2)	12,7 (7,05)
D-Glucose		18,5 (9,25)	14,4 (7,25)	13,1 (6,55)
Maltose	Cycloheptaamylose	4,9 (2,2)	17,6 (8)	33,9 (15,5)
D-Glucose		3,3 (1,4)	9,9 (4,15)	17,8 (7,5)
Maltose	Cyclooctaamylose	0,7 (0,25)	2 (0,75)	2,5 (1)
D-Glucose		0,6 (0,2)	1 (0,35)	1,7 (0,6)
Maltose	Maltooligosaccharide	55,8 (44,85)	59,7 (50,5)	50,5 (46)
D-Glucose		70,3 (52)	71,4 (59,5)	67,4 (55,5)

<sup>a</sup>Substrat- und Akzeptorkonzentration 44mM,  $12 \times 10^{-6}$  mol Enzym/mol Substrat, Inkubationstemperatur 30°. Für die Aufarbeitung, siehe Material und Methoden. Angaben in % des Gesamtkohlenhydrats, in Klammern molare Konzentration (mM).

Methanol-präzipitierbaren D-Glucopyranosylketten und an Cycloheptaamylose sind mit dem Akzeptor D-Glucose generell geringer. Mit diesem Akzeptor besteht eine lineare Abhängigkeit des Gehalts an Cyclodextrinen von seiner Konzentration, die Mengen an linearen Transferprodukten sind im Bereich von 5,5mM bis 22mM grösser, bei geringerer Akzeptorkonzentration bzw. bei äquimolaren Konzentrationen von Substrat und Akzeptor kleiner als mit Maltose.

Wässrige Lösungen der Methanol-Präzipitate geben in Abhängigkeit von der Akzeptorkonzentration einen blauen bis purpurroten Iodkomplex. Ein Teil des Materials wird durch die Methanol-Fällung unlöslich. Je höher die Akzeptorkonzentration in den Transferansätzen war, desto geringer ist der retrogradierende Anteil. Entsprechend nehmen die zu ermittelnden  $\bar{P}_n$ -Werte der (1→4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylketten ab, die Absorptionsmaxima ihrer Iodkomplexe verschieben sich in den kürzerwelligen Bereich. Die Methanol-Präzipitate der Transferansätze mit dem Akzeptor D-Glucose enthalten generell weniger retrogradierende Komponenten als



jene mit Maltose, die  $\bar{P}_n$ -Werte der retrogradierten und der löslichen D-Glucopyranosylketten sind niedriger (Tab. III).

Obgleich die  $\bar{P}_n$ -Werte der Maltooligosaccharidfraktionen mit steigender Akzeptorkonzentration leicht abnehmen ( $\bar{P}_n$  5 bei der Akzeptorkonzentration von 0,7mm,  $\bar{P}_n$  4 bei einer solchen von 44mm), zeigen sich auf den Chromatogrammen keine Unterschiede: Neben D-Glucose sind unter den angewandten Bedingungen der Chromatographie Maltooligosaccharide bis zu Glc<sub>10</sub> nachzuweisen (Abb. 1).

*Einfluss der Inkubationsdauer auf die Zusammensetzung der Transferprodukte bei äquimolarer Konzentration von Substrat und Akzeptor.* Auch bei äquimolaren Konzentrationen von Substrat und Akzeptor sind in der frühen Phase der Transferreaktion längere, mit Methanol präzipitierbare (1→4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylketten nachzuweisen (Tab. IV). Die mit dem Akzeptor Maltose gebildete Menge ist 2,6 mal grösser ( $\bar{P}_n$  16) als die mit D-Glucose produzierte ( $\bar{P}_n$  15). Cycloheptaamylose liegt in dem Transferansatz mit Maltose in grösseren Mengen vor als in jenem mit Glucose, Cyclooctaamylose wurde mit beiden Akzeptoren nur wenig synthetisiert. Wie die Chromatographie der Oligosaccharidfraktionen zeigt, sind nach 6 h Inkubation die vorgelegten Akzeptoren verbraucht (Abb. 1). Für die weitere Inkubation wurden die Transferansätze geteilt, jeweils einer Hälfte der Transferansätze wurde Toluol zugefügt. Die gebildeten Transferprodukte wurden nach 96 h analysiert (Tab. IV): Das Methanol-präzipitierbare Material hat stark abgenommen, in den Toluol-Ansätzen sind praktisch keine längeren D-Glucopyranosylketten mehr nachzuweisen. Der Gehalt an Cycloheptaamylose nahm zu, die weitaus grösste Menge (und damit auch eine wesentlich grössere Menge an Cyclodextrinen insgesamt) wird mit dem „Initial-Akzeptor“ Maltose in Gegenwart von Toluol erhalten. Mit D-Glucose sind die Ausbeuten an Oligosacchariden höher als mit dem Akzeptor Maltose.

TABELLE V

ABHÄNGIGKEIT DER PRODUKTZUSAMMENSETZUNG VON DER SUBSTRAT(MALTOSE)KONZENTRATION<sup>a</sup>

Produkt	Substratkonzentration (mm)		
	4,5	9	18
Methanol-Präzipitat		0,9 (0,4)	2,2 (0,2)
Cyclohexaamylose	48,5 (2,3)	38,9 (3,07)	32,8 (6,2)
Cycloheptaamylose	4,7 (0,19)	13,3 (1)	16,4 (2,5)
Cyclooctaamylose	1,2 (0,04)	2,2 (0,15)	5,5 (0,74)
Maltooligosaccharide	45,6 (2,8)	44,7 (5,5)	43,1 (10,7)

<sup>a</sup>0,25 Mol Akzeptor (Maltose)/mol Substrat,  $12 \times 10^{-6}$  mol Enzym/mol Substrat, 48 h Inkubation bei 30° in Gegenwart von Toluol. Für die Aufarbeitung, siehe Material und Methoden. Angaben in % des Gesamtkohlenhydrats, in Klammern molare Konzentration (mm).

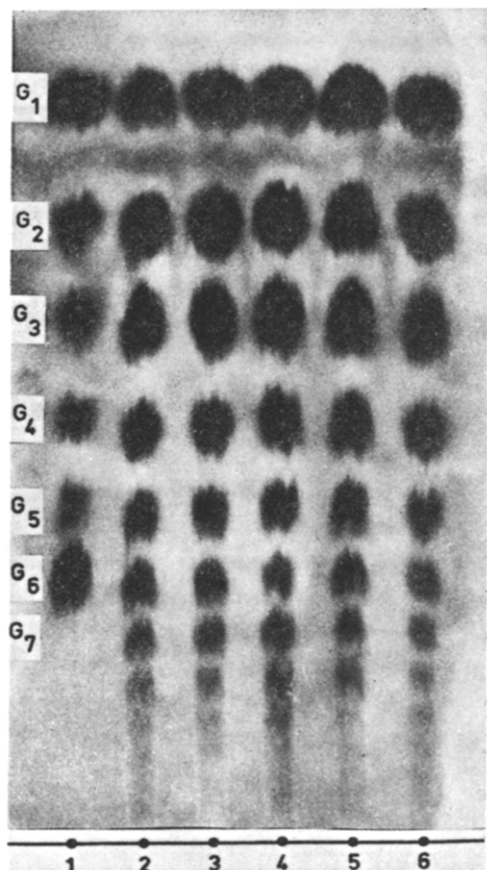


Abb. 1. Zusammensetzung der Maltooligosaccharidfraktionen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei äquimolaren Konzentrationen von Substrat und Akzeptor (Substrat- und Akzeptorkonzentration  $44\text{mM}$ ,  $12 \times 10^{-6}$  Mol Enzym/Mol Substrat. Inkubation bei  $30^\circ$ . Für die Aufarbeitung, siehe Material und Methoden. Chromatographie in Wasser-Äthanol-Nitromethan (5:8:7, v/v), dreimal absteigend. Das Chromatogramm wurde mit  $\text{AgNO}_3$  in Aceton und methanolischer  $\text{NaOH}$  entwickelt.  $G_1$ , D-Glucose,  $G_2$  Maltose, usw.): (1) Partialhydrolysat von Cyclohexaamylose, (2) Maltooligosaccharide nach 6 h, (3) nach 96 h Inkubation mit dem Akzeptor Maltose. (4) Maltooligosaccharide nach 6 h Inkubation, (5) nach 96 h Inkubation mit dem Akzeptor D-Glucose. (6) Maltooligosaccharide nach 96 h Inkubation mit dem Akzeptor Maltose in Gegenwart von Toluol. (Das Chromatogramm ist für die Zusammensetzung der Maltooligosaccharidfraktionen aller durchgeführten Transferansätze repräsentativ).

*Zusammensetzung der Transferprodukte in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.* Die Bildung längerer (1→4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylketten sowie die zu Cyclohepta- bzw. Cyclooctaamylose führenden Zyklisierungsreaktionen sind von der Anfangskonzentration des Substrates Cyclohexaamylose abhängig (Tab. V): Die Mengen an Methanol-präzipitierbarem Material, an Cycloheptaamylose und Cyclooctaamylose nehmen mit steigender Substratkonzentration zu, sie liegen jedoch deutlich unter denen, die bei  $44\text{mM}$  Substratkonzentration bei gleichem Substrat: Akzeptor-Verhältnis gefunden werden. Der Gehalt an Maltooligosacchariden und an

Cyclohexaamylose ist dagegen, bezogen auf die Anfangskonzentration des Substrates, deutlich grösser. Die Summe der linearen Komponenten und die Summe der Cyclo-dextrine sind bei den gewählten Substratkonzentrationen etwa gleich.

#### DISKUSSION

Die durch Transferreaktionen der CGT von *Klebsiella pneumoniae* M 5 al aus dem Substrat Cyclohexaamylose und den Akzeptoren D-Glucose oder Maltose zu erhaltenden Mengen an längeren, amylose-ähnlichen (1→4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylketten, an Maltooligosacchariden sowie an Cyclohexa- Cyclohepta- und Cyclooctaamylose sind von den Faktoren Substratkonzentration, Akzeptorkonzentration und „Akzeptorqualität“ abhängig. Mit dem Akzeptor Maltose werden signifikant grössere Mengen an Methanol-präzipitierbaren (1→4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylketten mit höherem  $\bar{P}_n$  sowie (bei höheren Akzeptorkonzentrationen) grössere Mengen an Cycloheptaamylose produziert.

Von den in unseren Transferansätzen gleichzeitig, jedoch mit unterschiedlicher Effizienz ablaufenden Reaktionen (1) und (2) interessieren uns als Kernfrage die Voraussetzungen, die für die Zyklisierung einer D-Glucosekette nach (1) gegeben sein müssen. Nach Kenntnis der helikalen Struktur von Amylose war die Annahme naheliegend, dass die CGT vom nicht reduzierenden Ende der Kette her jeweils eine Spiralwindung unter Zyklisierung abspaltet<sup>30,31</sup>. Während die Amylose in der V-Konfiguration in der Tat als steife, regelmässige Helix mit 6 D-Glucopyranosylresten pro Windung vorliegt<sup>32</sup>, besitzt sie in wässriger Lösung sehr wahrscheinlich eine lockere, langgestreckte helikale Struktur mit<sup>33,34</sup> bzw. ohne<sup>35</sup> „random coil“-Regionen. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass eine vorgegebene helikale Struktur der Amylose direkte Ursache für die Zyklisierungsreaktion ist. Da sowohl Cyclohexa-, Cyclohepta- und Cyclooctaamylose als hauptsächliche unverzweigte Cyclodextrine entstehen, kann der Ringschluss so spezifisch wohl nicht sein. Nach French<sup>6</sup> soll es zum Ringschluss kommen, wenn Maltooligosaccharide von „rechter Länge (Glc<sub>6</sub> oder Glc<sub>7</sub>)“ am Enzym gebunden werden.

Generell katalysiert die CGT den Transfer einer (1→4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylkette auf einen Akzeptor. Bei dieser Reaktion wird eine  $\alpha$ -D-(1→4)-glucosidische Bindung gespalten und eine neue geknüpft. Wie bei der Amylomaltase von *Escherichia coli*<sup>3</sup> wird der das nicht reduzierende Ende enthaltende Teil der Kette über die Hydroxylgruppe an C-1 auf die Freie Hydroxylgruppe an C-4 des Akzeptors transferiert. Bei der „Kupplungsreaktion“ muss primär eine  $\alpha$ -D-(1→4)-glucosidische Bindung der Cyclodextrine gespalten werden, damit die entstehende lineare (1→4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylkette auf den Akzeptor übertragen werden kann. Es ist naheliegend, sowohl für die Zyklisierungs- wie auch für die Disproportionierungsreaktion die Spaltung einer  $\alpha$ -D-(1→4)-glucosidischen Bindung als primär anzunehmen. Intermediär produkt dieser Spaltung ist die Bildung eines D-Glucopyranosyl-Enzym-Komplexes<sup>36-38</sup>. Die enzymgebundene (1→4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylkette wird in einem zweiten Schritt auf den Akzeptor übertragen. Das Enzym sollte demnach

neben Bindungsstellen für das Substrat (siehe für  $\alpha$ -Amylase<sup>39</sup>) = Donor auch solche für den Akzeptor haben. Ist diese Akzeptor-bindungsstelle unbesetzt, dann könnte bei entsprechender Kettenlänge des Substrates dessen nicht reduzierendes Ende als Akzeptor dienen, es kommt zur Zyklisierung: (1) ist dann eine Spezifizierung von (2). Die Frage muss offen bleiben, ob das Enzym eine vorgegebene „Substratschleife“ stabilisiert oder ob eine ungekrümmte D-Glucopyranosylkette „zurechtgebogen“ wird. Für unsere Vorstellung spricht die Tatsache, dass beispielsweise lösliche Stärke ohne Zunahme an zyklischen Produkten wesentlich schneller zu Maltooligosacchariden abgebaut wird, wenn dem Spaltansatz D-Glucose als Akzeptor zugefügt wird<sup>40,41</sup>. Eine Akzeptorbindungsstelle sollte aber auch aufgrund ihrer Spezifität zwischen verschiedenen Akzeptoren differenzieren können: Wir werden die Frage zu prüfen haben, ob die sich nach unseren Versuchen ergebenden Unterschiede zwischen dem Akzeptor Maltose und dem Akzeptor D-Glucose ihre Erklärung in der Spezifität der Akzeptorbindungsstelle finden, oder ob alleinige Ursache dafür die Tatsache ist, dass das primäre Transferprodukt von Cyclohexaamylose auf Maltose um einen D-Glucopyranosylrest länger als jenes auf D-Glucose ist.

Unsere Ergebnisse machen einen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Methanol-präzipitierbaren (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylketten ( $\bar{P}_n$  16) und der Menge an Cycloheptaamylose, aber auch derjenigen an Cyclohexaamylose wahrscheinlich [evtl. Gleichgewicht der Reaktion (1)]: Bei äquimolaren Konzentrationen von Substrat und Akzeptor enthalten die Transferansätze in ihrer frühen Phase mit dem Akzeptor Maltose 2,6 mal mehr solcher D-Glucopyranosylketten (primäre Transferprodukte?) als jene mit D-Glucose. Da die vorgelegten Akzeptoren verbraucht sind, müssen zu weiteren Transferreaktionen die Transferprodukte der Ansätze dienen. Deren Zusammensetzung ist aber mit Ausnahme der (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylketten mit  $\bar{P}_n$  16 mit beiden Initialakzeptoren gleich. Der Gehalt an Cycloheptaamylose nimmt jedoch in den mit Maltose gestarteten Transferansätzen vor allem in Gegenwart von Toluol weit stärker zu als in den mit D-Glucose gestarteten. Nach 96 h Inkubation ist andererseits in den Ansätzen mit dem Akzeptor Maltose der Gehalt an Cyclohexaamylose in Abwesenheit von Toluol grösser als in dessen Gegenwart, er ist in beiden Fällen aber grösser als mit dem Akzeptor D-Glucose.

Die Abhängigkeit der Menge an Cyclooctaamylose entsprechend derjenigen an längeren (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glucopyranosylketten von der Akzeptorkonzentration deutet auf einen Zusammenhang zwischen D-Glucopyranosylketten  $> G_{20}$  und der Zyklisierung zu diesem Cyclodextrin.

#### DANK

Die diesem Bericht zugrunde liegenden Arbeiten wurden mit Mitteln des Bundesministers für Forschung und Technologie gefördert.

## LITERATUR

- 1 J. MONOD UND A. M. TORRIANI, *C.R. Acad. Sci.*, 227 (1948) 240–242.
- 2 H. WIESMEYER, *Methods Enzymol.*, 4 (1962) 141–144.
- 3 T. N. PALMER, B. E. RYMAN UND W. J. WHELAN, *Eur. J. Biochem.*, 69 (1976) 105–115.
- 4 D. FRENCH, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 12 (1957) 189–260.
- 5 J. A. DEPINTO UND L. L. CAMPBELL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 125 (1968) 253–258.
- 6 D. FRENCH, *M.T.P. Int. Rev. Sci. Org. Chem. Ser. 5*, (1975) 267–335.
- 7 J. A. THOMA UND L. STEWART, in R. L. WHISTLER UND E. F. PASCHALL (Eds.), *Starch: Chemistry and Technology*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1965, ss. 209–249.
- 8 S. KITAHATA UND S. OKADA, *Agric. Biol. Chem.*, 38 (1974) 2413–2417.
- 9 S. KITAHATA, N. TSUMYAMA UND S. OKADA, *Agric. Biol. Chem.*, 38 (1974) 387–393.
- 10 N. NAKAMURA UND K. HORIKOSHI, *Agric. Biol. Chem.*, 40 (1976) 753–757.
- 11 N. NAKAMURA UND K. HORIKOSHI, *Agric. Biol. Chem.*, 40 (1976) 935–941.
- 12 H. BENDER, *Arch. Microbiol.*, 111 (1977) 271–282.
- 13 W. S. MCCLENAHAN, E. B. TILDEN UND C. S. HUDSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) 2139–2144.
- 14 D. FRENCH, M. L. LEVINE, J. H. PAZUR UND E. NORBERG, *J. Am. Chem. Soc.*, 71 (1949) 353–358.
- 15 N. NAKAMURA UND K. HORIKOSHI, *Agric. Biol. Chem.*, 40 (1976) 1647–1648.
- 16 K. KAINUMA, A. NOGAMI UND C. MERCIER, *J. Chromatogr.*, 121 (1976) 361–369.
- 17 F. CRAMER UND D. STEINLE, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 595 (1955) 81–100.
- 18 N. NAKAMURA UND K. HORIKOSHI, *Agric. Biol. Chem.*, 40 (1976) 1785–1791.
- 19 H. BENDER, *Arch. Microbiol.*, 113 (1977) 49–56.
- 20 F. BOELTZ, Diplomarbeit, Universität Freiburg, 1975.
- 21 D. LINDER, G. KURZ, H. BENDER UND K. WALLENFELS, *Eur. J. Biochem.*, 70 (1976) 291–303.
- 22 H. BENDER UND K. WALLENFELS, *Biochem. Z.*, 334 (1961) 79–95.
- 23 D. FRENCH, A. D. PULLEY, J. A. EFFENBERGER, M. A. ROUGVIE UND M. ABDULLAH, *Arch. Biochem. Biophys.*, 111 (1965) 153–160.
- 24 J. A. THOMA UND D. FRENCH, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 1645–1648.
- 25 W. E. TREVELYAN, D. P. PROCTER UND J. S. HARRISON, *Nature (London)*, 166 (1950) 444–445.
- 26 R. G. SPIRO, *Methods Enzymol.*, 8 (1966) 3–36.
- 27 F. J. VILES UND L. SILVERMAN, *Anal. Chem.*, 21 (1949) 950–953.
- 28 N. NELSON, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 375–380.
- 29 W. WÄLTER, in H. M. RAUEN (Ed.), *Biochem. Taschenbuch*, Teil 1, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Göttingen und Heidelberg, 1964, ss. 106–178.
- 30 C. F. CORI, *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 4 (1945) 226.
- 31 K. MYRBÄCK UND L. G. GJÖRLING, *Ark. Kem. Mineral. Geol. Ser. A*, 20 (1945) 1–13.
- 32 C. T. GREENWOOD, in W. PIGMAN UND D. HORTON (Eds.), *The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry*, Vol. IIB, Academic Press, New York, 1970, ss. 471–513.
- 33 M. B. SENIOR UND E. HAMORI, *Biopolymers*, 12 (1973) 65–78.
- 34 J. SZEITLI UND S. AUGUSTAT, *Staerke*, 18 (1966) 38–42.
- 35 Q. T. NGUYEN, P. APTEL UND J. NEEL, *Biopolymers*, 15 (1976) 2097–2100.
- 36 D. FRENCH, Y. C. CHAN UND B. ENGLAND, *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 33 (1974) 1313.
- 37 J. WAKIN, M. ROBINSON UND J. A. THOMA, *Carbohydr. Res.*, 10 (1969) 487–503.
- 38 J. A. THOMA, *J. Theor. Biol.*, 18 (1968) 297–310.
- 39 J. F. ROBYT UND D. FRENCH, *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 3917–3927.
- 40 S. KITAHATA UND S. OKADA, *Agric. Biol. Chem.*, 39 (1975) 2185–2191.
- 41 D. FRENCH, *Methods Enzymol.*, 5 (1962) 148–155.