

KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN DER DURCH DIE CYCLODEXTRIN-GLYCOSYLTRANSFERASE KATALYSIERTEN (1→4)- α -D-GLUCOPYRANO-SYLTRANSFERREAKTIONEN, INSbesondere DER ZYKLISIERUNGS-REAKTION, MIT (1→4)- α -D-GLUCOPYRANOSYLKETTEN (DURCH-SCHNITTlicher POLYMERISATIONSGRAD VON 16) ALS SUBSTRAT*

HANS BENDER

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

(Eingegangen am 8. November 1978; angenommen in revidierter Form am 4. April 1979)

ABSTRACT

The transfer reactions, particularly the cyclization reaction, catalyzed by the cyclodextrin glycosyltransferase $\{(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-glucan}:[(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranosyl}]$ -transferase (cyclizing), EC 2.4.1.19; CGT} from *Klebsiella pneumoniae* M 5 a1 were studied with (1→4)- α -D-glucopyranosyl chains (d.p. 16). The initial rate of the cyclization reaction with substrate concentrations from 1 up to 16 mM indicated a V of $6.2 \text{ kat} \cdot \text{kg}^{-1}$ of protein and a molar catalytical activity of $421.6 \text{ kat} \cdot \text{mol}^{-1}$ of enzyme. K_m was found to be 1.03 mM. In addition to the cyclization, CGT simultaneously catalyzed a disproportionation of the substrate, yielding shorter maltooligosaccharides and (1→4)- α -D-glucopyranosyl chains which were significantly longer than the substrate itself. Cyclohepta- and cycloocta-amylose were accumulated in the course of longer incubation. They arose mainly from coupling reactions with the initially formed cyclohexaamylose and corresponding disproportionation of these transfer products. The extremely low formation rates of the higher cyclodextrins point to a “mistake” of the enzyme, when cyclizing to cyclohepta- and cycloocta-amylose.

ZUSAMMENFASSUNG

Die von der Cyclodextrin-Glycosyltransferase $\{(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-glucan}:[(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranosyl}]$ -transferase (cyclizing), EC 2.4.1.19, CGT} katalysierten Transferreaktionen, insbesondere die Zyklisierungsreaktion, wurden mit (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten \bar{P}_n 16** bei Substratkonzentrationen von 1–16 mM untersucht. Aus der initialen Geschwindigkeit der Zyklisierungsreaktion ergab sich ein V von 6,2

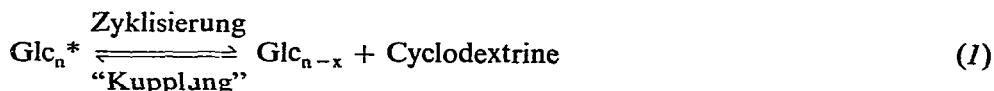
*4. Mitteilung über Cyclodextrin-Glycosyltransferase von *Klebsiella pneumoniae* M 5 a1; 3. Mitteilung, siehe Zit. 1.

** \bar{P}_n , durchschnittlicher Polymerisationsgrad.

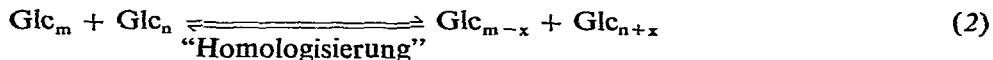
$\text{kat} \cdot \text{kg}^{-1}$ Protein bzw. eine molare katalytische Aktivität von $421,6 \text{ kat} \cdot \text{mol}^{-1}$ Enzym. K_m errechnete sich zu $1,03\text{mM}$. Parallel zu der Zyklisierung katalysierte die CGT eine Disproportionierung des Substrates, die zu kürzeren Maltooligosacchariden und zu $(1 \rightarrow 4)$ - α -D-Glucopyranosylketten führte, deren Längen deutlich über denen des Substrates lagen. Cyclohepta- und Cyclooctaamylose wurden im Verlauf einer längeren Inkubation angehäuft, sie entstanden hauptsächlich im Zuge von Kupplungsreaktionen mit der primär gebildeten Cyclohexaamylose und entsprechender Disproportionierung dieser sekundären Transferprodukte. Die extrem langsamen Bildungsgeschwindigkeiten von Cyclohepta- und Cyclooctaamylose berechtigen zu der Annahme, daß es sich bei der Zyklisierung zu den höheren Cyclodextrinen um "Fehler" des Enzyms handelt.

EINLEITUNG

Die durch die Cyclodextrin-Glycosyltransferase $\{(1 \rightarrow 4)$ - α -D-glucan: $[(1 \rightarrow 4)$ - α -D-glucopyranosyl]transferase (cyclizing) EC 2.4.1.19, CGT $\}$ katalysierten $(1 \rightarrow 4)$ - α -D-Glucopyranosyltransfer-Reaktionen sind durch die Gleichungen (1) und (2) charakterisiert.



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



Bei diesen Transferreaktionen wird generell eine α -D-($1 \rightarrow 4$)-glucosidische Bindung des Substrates (Donor) gespalten. Der das nicht reduzierende Ende enthaltende Teil der $(1 \rightarrow 4)$ - α -D-Glucopyranosylkette wird über OH-1 auf die freie OH-4 des Akzeptors transferiert. Reaktion (1) ist demnach insoweit ein Sonderfall von (2), als das freie, nicht reduzierende Ende des Substrates selbst als Akzeptor fungiert. Die Frage, welche Voraussetzungen gegeben sein müssen, damit dieser Sonderfall von (2) eintritt, ist bislang unbeantwortet. Sowohl bei der CGT von *Bacillus macerans* wie auch bei dem Enzym von *Klebsiella pneumoniae* M 5 a1 ist Cyclohexaamylose primäres zyklisches Produkt. Cycloheptaamylose und Cyclooctaamylose werden hauptsächlich im Verlauf sekundärer Transferreaktionen gebildet, sie nehmen zumindest nicht in dem Maße wie die Cyclohexaamylose an Rückreaktionen nach (1) teil¹⁻⁴. In verschiedenen Arbeiten wurde die Frage geprüft, ob die CGT aus definierten Maltooligosacchariden (Glc_2 - Glc_7) durch $(1 \rightarrow 4)$ - α -D-Glucopyranosyltransfer Cyclodextrine zu produzieren vermag^{1,2,5-9}. Es zeigte sich, daß die CGT Maltooligosaccharide $> \text{Glc}_2$ rasch disproportioniert. Wenngleich als Produkte dieser Transferreaktionen auch geringe

* Glc_n , $(1 \rightarrow 4)$ - α -D-Glucopyranosylketten mit n Glucopyranosylresten.

Mengen an Cyclodextrinen wie auch an längeren ($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucopyranosylketten nachgewiesen werden konnten, so blieb durch die zum Teil kontroversen Ergebnisse doch die eigentliche Frage nach den Vorbedingungen für die Zyklisierungsreaktion unbeantwortet. Ein vermuteter Zusammenhang zwischen der helikalen Konformation langer ($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucopyranosylketten (Amylosen) und dem Ringschluss zu Cyclodextrinen^{10,11} bleibt fraglich, da man weiß, daß die Amylosemoleküle in wässriger Lösung als lockere, langgestreckte Helices vorliegen¹²⁻¹⁴ (siehe dazu Lit.¹⁵). Unwahrscheinlich scheinen die Annahmen, daß es zum Ringschluss komme, wenn Maltooligosaccharide von "rechter Länge" (Glc₆ oder Glc₇) am Enzym gebunden werden¹⁶ oder daß jeweils der mittlere Teil einer entsprechend langen ($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucopyranosylkette zyklisiert wird, während ihre Enden als Maltooligosaccharide freiwerden². Die durch die CGT von *K. pneumoniae* durch Kuppelungs- und Disproportionierungsreaktionen mit dem Substrat Cyclohexaamylose und den Akzeptoren D-Glucose und Maltose gebildeten ($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucopyranosyltransfer-Produkte wurden kürzlich eingehender analysiert¹. Im Verlauf dieser Untersuchungen zeigte es sich, daß es unter Verwendung geeigneter Hilfsenzyme durchaus möglich ist, diese Transferreaktionen kinetisch zu erfassen^{1,5}. Dagegen bereiten kinetische Untersuchungen der Zyklisierungsreaktion Schwierigkeiten. Abgesehen davon, daß es für die Initialphase der in Richtung Zyklisierung verlaufenden Reaktion (1) kein für kinetische Messungen geeignetes Testsystem gibt, mangelt es auch an einem definierten Substrat Glc_n. Zur exakten Untersuchung muss schließlich die Möglichkeit gegeben sein, zwischen den Reaktionen (1) und (2) differenzieren zu können.

Unter den ($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucopyranosyltransfer-Produkten der CGT von *K. pneumoniae* M 5 a1 mit dem Substrat Cyclohexaamylose und dem Akzeptor Maltose finden sich¹ ($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucopyranosylketten mit \bar{P}_n -Werten > 16. Die Ausbeuten an solchen Ketten wie auch ihre durchschnittlichen Kettenlängen sind von der Inkubationszeit der Transferansätze und von dem Substrat-Akzeptor-Verhältnis abhängig. Da wir einen Zusammenhang zwischen ($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucopyranosylketten \bar{P}_n 16 und der Zyklisierungsreaktion vermuteten¹, war es naheliegend, diese Ketten als Substrate für Untersuchungen der Zyklisierungsreaktion einzusetzen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Material. — CGT wurde aus dem Kulturfiltrat von *Klebsiella pneumoniae* M 5 a1 nach Vorschrift isoliert und bis zur elektrophoretischen Einheitlichkeit gereinigt^{5,17}. β -Amylase [($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucan : maltohydrolase, EC 3.2.1.2] aus Bataten (~500 U/mg Protein, 3 x krist., reinst) war von Serva (Heidelberg, BRD), Amyloglucosidase [($1 \rightarrow 4$ oder 6)- α -D-Glucan : glucohydrolase, EC 3.2.1.3] von Boehringer (Mannheim, BRD). Cyclohexaamylose wurde mit der CGT von *K. pneumoniae* aus Kartoffelstärke (Henkel & Cie., Düsseldorf, BRD) gewonnen und im wesentlichen nach Thoma und Stewart¹⁸ gereinigt. Längere ($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucopyranosylketten wurden im präparativen Maßstab aus Transferansätzen der CGT (20 mg Protein/L) mit äquimolaren Mengen an Cyclohexaamylose und Maltose (je 44 mM) in 10 mM

Tris · HCl-Puffer, pH 7,2 (5mm an CaCl_2), nach 5 h Inkubation bei 30° durch Präzipitation mit Methanol (1,5 Vol.) abgetrennt und durch viermaliges Umfällen mit Methanol gereinigt. Kürzere ($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucopyranosylketten wurden aus den Methanol-Überständen der gleichen Transferansätze nach schonender Konzentrierung auf 1/8 des Volumens im Rotationsverdampfer mit Methanol (2,5 Vol.) präzipitiert und ebenfalls durch viermaliges Umfällen mit Methanol gereinigt. Alle anderen verwendeten Substanzen wurden in handelsüblicher falls erforderlich, in reinster Form verwendet.

Analytische Methoden. — Kohlenhydrate wurden mit Anthron^{19,20}, reduzierende Aldehydgruppen mit dem Nelson-Reagens²¹ bestimmt. Die \bar{P}_n -Werte der linearer ($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucopyranosylketten wurden nach Gesamtkohlenhydrat (als D-Glucose)/reduzierende Glucoseenden bestimmt²². Die enzymatische D-Glucosebestimmung mit D-Glucoseoxidase-Peroxidase wurde nach gegebener Vorschrift vorgenommen²³.

Durchführung und Aufarbeitung der Transferansätze. — Die Zeitabhängigkeit der Transferreaktionen wurde in 10mm Tris · HCl-Puffer, pH 7,2 (5mm an CaCl_2), bei Substratkonzentrationen von 1–20mm und bei einer CGT-Konzentration von 14 mg Protein/L verfolgt, jeweils 100 mL der Transferansätze wurden für einen Zeitwert eingesetzt. Das Substrat wurde in dem Puffer durch vorsichtiges Erhitzen gelöst, Inkubationstemperatur war 30°. Die enzymatische Reaktion wurde nach Erreichen der gewünschten Inkubationszeiten durch schnelle Zugabe von Methanol (1,5 Vol.) gestoppt. Die Aufarbeitung der Transferansätze zur Analyse der gebildeten Produkte erfolgte nach beschriebener Methode¹, für die Kurzzeitmessungen wurde das Aufarbeitungsschema in der folgenden Weise modifiziert:

(a) Die mit 1,5 Vol. Methanol präzipitierbaren ($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucopyranosylketten $> \text{Glc}_{13}$ wurden nach 24 h Stehen der Fällungen bei 0° abzentrifugiert, dreimal nach Lösen in je 60 mL dest. Wasser mit Methanol (1,5 Vol.) repräzipitiert und anschliessend lyophilisiert.

(b) Die vereinigten Überstände aus (a) wurden im Rotationsverdampfer auf Volumina von 30 mL eingeengt und entsprechend der Menge an gebildeter Cyclohexaamylose mit 5–24 mL einer Lösung von 0,08M Iod in 0,1M Kaliumiodid versetzt. Die Iodeinschlusskomplexe wurden nach 12 h Stehen der Fällungen bei 0° abzentrifugiert, die erhaltene Cyclohexaamylose einmal als Iodclathrat umgefällt und anschliessend lyophilisiert.

(c) Die Maltooligosaccharide enthaltenden Überstände aus (b) wurden nach Erhitzen (zur Sublimation überschüssigen Iods) lyophilisiert.

Die Bestimmung der Ausbeuten an Transferprodukten sowie die Prüfung der Vollständigkeit der Fraktionierung wurde wie folgt vorgenommen:

(a) Die Mengen an den in 60% Methanol unlöslichen ($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucopyranosylketten wurden sowohl gravimetrisch wie auch colorimetrisch mit Anthron bestimmt. Bis zur Gewichtskonstanz bei 110° getrocknete Proben des frischen Lyophilisats ergaben einen Wassergehalt von 12%. Die nach Trocknen erhaltenen Auswagen der Fraktionen stimmten mit den Anthronwerten innerhalb der Fehlergrenze überein. Zur Reinheitsprüfung wurden je 100 mg der Fraktionen in 60mm Acetat-

puffer (pH 4,8, 30 mL) gelöst und mit Amyloglucosidase (0,2 mg) bei 30° solange inkubiert, bis keine Zunahme des Reduktionswertes mehr nachzuweisen war. Die Bestimmung der Reduktionswerte und die enzymatische D-Glucosebestimmung ergaben eine 100%ige Umwandlung in D-Glucose. Demnach waren die erhaltenen Fraktionen der längeren (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten frei von zyklischen Transferprodukten.

(b) Cyclohexaamylose wurde gravimetrisch als Iodclathrat anhand der Kristallform des Clathrats bestimmt, wobei für die Berechnung die in der Literatur für die entsprechende Kristallform angegebenen Iod- und Kristallwasser-Werte zugrunde gelegt wurden⁶. Die parallel durchgeführten colorimetrischen Kohlenhydratbestimmungen deckten sich mit den durch Auswage der Iodclathrate erhaltenen Werten. In Lösungen der Cyclohexaamylose-Faktionen konnten auch nach Inkubation mit Amyloglucosidase keine reduzierenden Aldehydgruppen nachgewiesen werden. Demnach war die Cyclohexaamylose frei von reduzierenden Maltooligosacchariden.

(c) Der Kohlenhydratgehalt der Maltooligosaccharid-Faktionen wurde colorimetrisch mit Anthron bestimmt. Proben der Fraktionen wurden nach Entfernung der Puffersalze bzw. des Kaliumiodids durch Ionenaustauscher (Amberlite IR-120–Amberlite IR-400, Serva, Heidelberg, BRD) lyophilisiert und anschliessend bei 110° bis zur Gewichtskonstanz nachgetrocknet. Die Auswagen deckten sich mit den ermittelten Anthron-Werten. Durch Inkubation mit Amyloglucosidase war das Material zu 97% zu D-Glucose abzubauen. Die in den Maltooligosaccharidfraktionen enzymatisch nachweisbaren geringen Mengen an zyklischen Transferprodukten (durch Amyloglucosidase nicht spaltbar) wurden den Cyclodextrinfaktionen zuaddiert.

Alle angegebenen Werte wurden aus jeweils vier Analogansätzen gemittelt. Die Variationskoeffizienten für die in vier verschiedenen Ansätzen nach jeweils gleicher Inkubationszeit zu bestimmenden Transferprodukte betrugen zwischen $\pm 1,3\%$ und $\pm 1,8\%$.

ERGEBNISSE

Charakterisierung der (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten \bar{P}_n 16 (S_1). — Bislang stehen keine befriedigenden chromatographische Methoden zur Verfügung, (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten mit Längen $> \text{Glc}_{14}$ exakt zu fraktionieren. Die Chromatographie an Sephadex G-50 ergibt nur ein grobes Verteilungsmuster der Kettenlängen²⁴. Beschriebene enzymatische²⁵ bzw. recht aufwendige Verfahren der organisch-chemischen Analyse sind kaum aussagekräftiger als eine Bestimmung der durchschnittlichen Kettenlängen durch das Verhältnis Gesamtkohlenhydrat/reduzierende D-Glucoseenden²². Wir beschränkten uns deshalb bei der Ermittlung der \bar{P}_n -Werte auf die letztgenannte Methode. Die Streuung der Kettenlängen kann grob durch Papierchromatographie und durch die Intensität der "Farben" der Iodkomplexe abgeschätzt werden, wobei durch die Iodbindungskapazität der (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten sowie durch die temperaturabhängige Stabilität der Iodkomplexe zusätzliche Hinweise zu erhalten sind^{26,27}. Die erhaltenen Daten sprechen

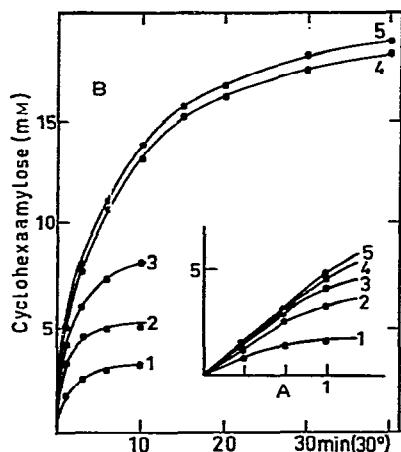


Abb. 1. Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamylose in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (S_1). (A) Initiale Bildungsgeschwindigkeit in der ersten Minute der Inkubation. (B) Verlauf der Zunahme an Cyclohexaamylose während 40 min Inkubation (30°). Kurvenschar 1–5 Anfangskonzentrationen des Substrates 1, 3, 6, 13, 16 mM (14 mg CGT/L). Für die Aufarbeitung der Transferansätze und die Ausbeuten-Berechnung siehe Experimenteller Teil.

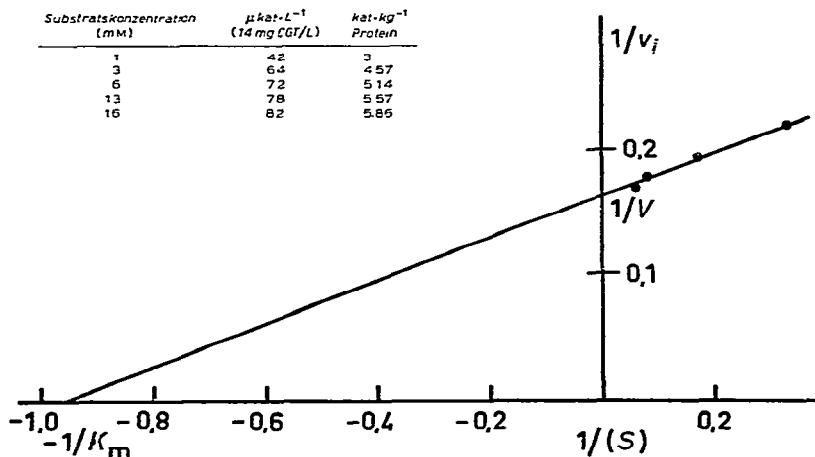


Abb. 2. Initiale Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamylose in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (S_1). Darstellung von $1/v_i$ gegen $1/(S)$ nach Zit. 28. Die Anfangskonzentrationen des Substrates waren 1, 3, 6, 13 und 16 mM (14 mg CGT/L), für die Berechnung liegen die nach 30 s Inkubation (30°) ermittelten Mengen an Cyclohexaamylose zugrunde. Der für die Anfangskonzentration von 1 mM erhaltene $1/(S)$ -Wert liegt ausserhalb des dargestellten Bereichs der Geraden.

dafür, daß die Streuung der Kettenlängen von S_1 mit Grenzwerten von etwa Glc₁₄ bis Glc₁₉ nicht sehr breit ist. Erwartungsgemäß wird S_1 durch β -Amylase vollständig zu Maltose (Maltotriose) abgebaut, d.h. es enthält ausschließlich α -D-(1→4)-glucosidische Bindungen.

Zeitlicher Verlauf der (1→4)- α -D-Glucopyranosyltransfer-Reaktionen in Ab-

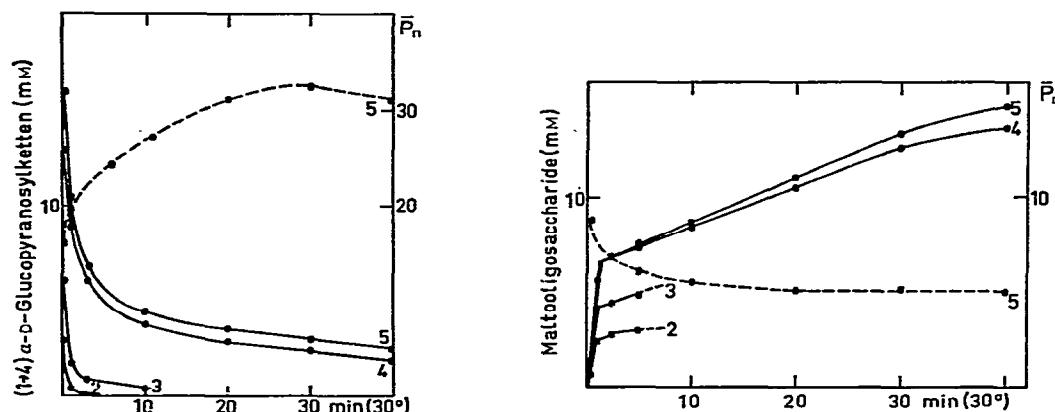


Abb. 3. Zeitumsatzkurven in Abhängigkeit von den Anfangskonzentrationen des Substrates (S_1). Kurvenschar 2-5 (—), Anfangskonzentrationen des Substrates 3, 6, 13 und 16 mm (14 mg CGT/L); (---) Zunahme der \bar{P}_n -Werte der bei 60% Methanol unlöslichen (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten im Verlauf der Inkubation (Substratkonzentration 16 mm). Für die Aufarbeitung der Transferansätze und die Bestimmung der \bar{P}_n -Werte siehe Experimenteller Teil.

Abb. 4. Verlauf der Zunahme an Maltooligosacchariden in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (S_1). Kurvenschar 2-5 (—), Anfangskonzentrationen des S_1 :Substrates 3, 6, 13 und 16 mm (14 mg CGT/L); (---) Abnahme der \bar{P}_n -Werte der Maltooligosaccharidfraktionen im Verlauf der Inkubation (30°) bei der Substratkonzentration von 16 mm. Für die Aufarbeitung der Transferansätze und die Berechnung der Ausbeuten siehe Experimenteller Teil.

hängigkeit von der Substratkonzentration (S_1). — (a) Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamylose. Die Anfangsgeschwindigkeit der Transferreaktion, gemessen an der Bildung von Cyclohexaamylose, wurde mit den Substratkonzentrationen von 1,3, 6,13 und 16 mm verfolgt (Abb. 1A). Anhand der in den ersten 30 s der Inkubation gemessenen Bildungsgeschwindigkeiten und der graphischen Darstellung von $1/v_i$ gegen $1/(S)$ nach Lineweaver und Burk²⁸ (Abb. 2) ergibt sich für V der Wert von 6,2 kat · kg⁻¹ Protein bzw. mit dem Substrat S_1 eine molare katalytische Aktivität von 421,6 kat · mol⁻¹ Enzym. Die Michaelis-Konstante K_m (30°, 10 mm Tris · HCl-Puffer, pH 7,2) errechnet sich zu 1,03 mm.

(b) Zeitumsatz des Substrates. Entsprechend der abnehmenden Geschwindigkeit der Zyklisierungsreaktion (Abb. 1B) verlangsamt sich im Verlauf der Inkubation der Substratumsatz (Abb. 3)*. Für die aus den Zeitproben mit 1,5 Vol. Methanol präzipitierbaren (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten ergeben sich wesentlich höhere \bar{P}_n -Werte als für das eingesetzte Substrat: Die durchschnittlichen Kettenlängen steigen im Verlauf von 20 min Inkubation auf Werte um Glc₃₂. Bei diesen Ketten handelt

*Der zeitabhängige Verlauf der Bildung von Cyclohexaamylose ähnelt demjenigen einer Reaktion erster Ordnung: Die Zeitumsatzkurve einer Reaktion erster Ordnung lässt sich halblogarithmisch als Gerade darstellen, wenn $\log(S)/(S_t)$ gegen die Zeit aufgetragen wird [(S_t) Konzentration des Substrates zur Zeit t]. Die halblogarithmische Auftragung der ermittelten Substratwerte ergibt bei den Ansätzen mit höherer Anfangskonzentration des Substrates zwei Gerade mit unterschiedlichen Steigungen.

es sich demnach nicht ausschliesslich um Restsubstrat, sondern zumindest zu einem Teil um Disproportionierungsprodukte der CGT (Abb. 3).

(c) *Verlauf der Zunahme an kürzeren, linearen Transferprodukten.* Die Menge der bei den Transferreaktionen entstehenden, in 60% Methanol löslichen kürzeren ($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucopyranosylketten (als Maltooligosaccharide bezeichnet) nimmt während 30 min Inkubation linear mit der Zeit, jedoch in zwei Phasen unterschiedlicher Geschwindigkeit zu (Abb. 4). Die \bar{P}_n -Werte dieser Transferprodukte sinken im Verlauf der Inkubation von 8,8 (20_s) auf etwa 5.

Bildung von Cyclohepta- und Cyclooctaamylose aus dem Substrat S₁. — Nach 40 min Inkubation mit dem Substrat S₁ sind in den Transferansätzen nur Spuren an Cycloheptaamylose nachzuweisen. Es war deshalb interessant, die Transferreaktionen über längere Zeiträume zu verfolgen. Ansätze mit einer Anfangskonzentration des Substrates von 16mm wurden nach 20 min Inkubation aufgeteilt und jeweils ohne Clathratbildner bzw. mit Toluol oder 1,1,2-Trichloräthan weiter inkubiert. Die nach 2, 6 und 20 h Inkubation erhaltenen Transferprodukte sind in Tab. I zusammengestellt. Während sich die Mengen an Cyclohexaamylose in Gegenwart von 1,1,2-Trichloräthan zunächst halten bzw. sich leicht erhöhen und erst nach 20 h Inkubation abgenommen haben, verringert sich der Gehalt an diesem Cyclodextrin in den Ansätzen ohne Clathratbildner bzw. in Gegenwart von Toluol offensichtlich zu Gunsten der höheren Cyclodextine. Der Ansatz mit Toluol enthält die grösste Menge an Cyclohepta-, derjenige ohne Clathratbildner die grösste Menge an Cyclo-

TABELLE I

($1 \rightarrow 4$)- α -D-GLUCOPYRANOSYLTRANSFER-PRODUKTE MIT DEM SUBSTRAT S₁ NACH LÄNGERER INKUBATIONSZEIT IN ABWESENHEIT BZW. IN GEGENWART VON CLATHRATBILDNERN^a

Produkt	Inkubationszeit (h)	Ohne Clathratbildner ^b	Mit Toluol	Mit 1,1,2-Trichloräthan
Methanolpräzipitat	2	4 (22,6)	3,9 (20)	1,6 (15,4)
	6	2,6 (19,6)	2,4 (18)	1,4 (14,1)
	20	1,7 (16,2)	1,4 (14,2)	1,9 (16,4)
Cyclohexaamylose	2	11,7	10,1	22,7
	6	10,7	10	24
	20	6	5	10,6
Cycloheptaamylose	2	1,8	2,6	0
	6	3,2	5,9	0
	20	8	12,1	6,2
Cyclooctaamylose	2	0,4	0,26	0
	6	1,8	0,9	0
	20	5	2,5	0,3
Maltooligosaccharide	2	15,7	14,6	14,7
	6	16,1	15,4	14,9
	20	15,6	15,2	18,5

^aAngaben in molarer Konzentration. Anfangskonzentration des Substrates 16mm, 14mg CGT/L, Inkubationstemperatur 30°. Für die Aufarbeitung siehe Zit. 1. ^bIn Klammern \bar{P}_n -Werte.

octaamyllose. Die Mengen an den in 60% Methanol unlöslichen (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten nehmen langsam, in dem 1,1,2-Trichloräthan-haltigen Ansatz jedoch bis zu 6 h Inkubation stark ab. Die durchschnittlichen Kettenlängen verkleinern sich im Verlauf der Inkubation. Der Gehalt an Maltooligosacchariden ändert sich während der 20-stündigen Inkubation nur geringfügig.

DISKUSSION

Mit dem Substrat S₁ katalysiert die CGT von *K. pneumoniae* parallel zur Zyklierung Disproportionierungsreaktionen, die zu Maltooligosacchariden und zu (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten führen, die signifikant länger als das Substrat S₁ sind. Die Zyklierungsreaktion scheint limitiert (Tab. II). Diese Limitierung, deren Folge eine verstärkte Disproportionierung des Substrates ist, mag folgende Ursache haben: Wir vermuteten, daß es dann zur Zyklierung komme, wenn eine entsprechend lange (1→4)- α -D-Glucopyranosylkette am Enzym gebunden wird und die Akzeptorstelle unbesetzt bleibt¹. Die Wahrscheinlichkeit einer unbesetzten Akzeptorstelle sollte aber mit steigender Substratkonzentration geringer werden. Eine Korrektur der für die initiale Phase der Transferreaktion experimentell ermittelten, von der Anfangskonzentration des Substrates und damit von v_i abhängigen Werte für pro mmol Substrat gebildete mmole Cyclohexaamyllose auf V bestätigt diese Vermutung.

Für die im Verlauf der Inkubation abnehmende Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamyllose ist eine Verarmung an Substrat nicht verantwortlich, da die zu bestimmenden Mengen an (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten > Glc₁₆ über dem für die Zyklierung ermittelten K_m -Wert liegen. Ursache könnte eine Annäherung an das Reaktionsgleichgewicht sein*. Zur Klärung dieser Frage sollten einige modifizierte Transferansätze beitragen (Tab. III).

(a) Die als lineare Transferprodukte mit dem Substrat S₁ zu erhaltenden (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten > Glc₂₆ (S₂) sind hinsichtlich der Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamyllose gleichwertige Substrate. Der Zeitumsatz von S₂ ist dagegen geringer, in entsprechender Weise nimmt die Menge an Maltooligosacchariden langsamer zu. Dieser Transferansatz liefert die Erklärung dafür, warum der Zeitumsatz des Substrates S₁ und die zeitabhängige Zunahme an Maltooligosacchariden in zwei distinkten Phasen erfolgen: Mit der Anhäufung der längeren linearen Disproportionierungsprodukte aus S₁ verlangsamt sich die Geschwindigkeit des Umsatzes (Exp. A und B).

(b) Der Zusatz von Maltooligosacchariden zu einem Transferansatz mit dem Substrat S₁ hat keinen Einfluss auf die initiale Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamyllose, er beeinflusst jedoch den Zeitumsatz des Substrates. Die bereits nach

*Von Pazur (siehe Zit. 6) wurden für die Reaktion (I) Gleichgewichtskonstante angegeben ($K_{\text{Cyclohexa}} = 0,021$, $K_{\text{Cyclohepta}} = 0,056$, $K_{\text{Cyclooctaamyllose}} = 0,035$). Nach den vorliegenden Befunden ist mit dem von uns verwendeten Substrat eine Trennung der reversiblen Reaktionen (I) und (2) nicht möglich, so daß K_{eq} ausschließlich für (I) nicht angegeben werden kann.

TABELLE II

ABHÄNGIGKEIT DER ZYKLISIERUNGSREAKTION VON DER WAHRSCHEINLICHKEIT UNBESETZTER AKZEPTORSTELLEN DER CGT BEI VERSCHIEDENEN ANFANGSKONZENTRATIONEN DES SUBSTRATES S₁. PRO MMOL SUBSTRAT GEBILDETE MMOL CYCLOHEXAAMYLOSE NACH 1 MIN INKUBATION (30°)^a

Substratkonzentration (mm)	Wahrscheinlichkeit unbesetzter Akzeptorstellen (%)	Cyclohexaamylose (mmol)/Substrat (mmol)	
		Experimentell ermittelte Werte	Experimentell ermittelte Werte, auf V korrigiert
3	100	1,08	1,733
6	50	0,675	0,867
16	~20	0,309	0,324

^aDie Wahrscheinlichkeit unbesetzter Akzeptorstellen wurde für die Anfangskonzentration des Substrates von 3 mm = 100% gesetzt.

TABELLE III

INITIALE BILDUNGSGESCHWINDIGKEIT VON CYCLOHEXAAMYLOSE UND SUBSTRATUMSATZ MIT DEM SUBSTRAT S₂ [(1→4)- α -D-GLUCOPYRANOSYLKETTEN > Glc₂₆] UND DEM SUBSTRAT S₁ BEI ZUSATZ VON MALTO-OLIGOSACCHARIDEN (\bar{P}_n 6,3) BZW. CYCLOHEXAAMYLOSE^a

	Experiment				
	A	B	C	D	E
Substrat	S ₁	S ₂	S ₁	S ₁	S ₁
Substratkonz. (mm)	13	11	9	9	13
Zusatz zum Transferansatz (mm)			Maltooligo-saccharide(7)	Cyclohexa-amylose(6,6)	Cyclohexa-amylose(8)
v _t (Cyclohexaamylose) (kat· kg ⁻¹ Protein)	5,57	5,4	5,2	5,1	5,08
S _t (40 min, mm) ^c	1,9(32) ^b	5(31)	0,6(30,2)	2,2(32)	4,8(31,8)
Cyclohexaamylose (mmol)/verbrauchtes Substrat (mmol, 1 min Inkubation)	1,02	1,92			

^aZum Vergleich sind die mit dem Substrat S₁ ohne Zusätze erhaltenen Werte nochmals aufgeführt. Für weitere Erläuterungen siehe Text. ^bIn Klammern die für (S_t) ermittelten \bar{P}_n -Werte. ^cS_t zum Zeitpunkt t (40 min Inkubation) zu bestimmende Konzentrationen an in 60% Methanol unlöslichen (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten.

1 min Inkubation zeitkonstante geringe Zunahme an Maltooligosacchariden spricht für ein Gleichgewicht der Reaktion (2), welches allerdings durch den Schwund an längeren (1→4)- α -D-Glucopyranosylketten durch Zyklisierungsreaktionen (1) verschoben wird. Dieser Transferansatz zeigt, daß die Maltooligosaccharide in der Initialphase der Transferreaktionen offensichtlich keinen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit haben, mit welcher bei gegebener Substratkonzentration die Akzeptor-

stellen des Enzyms unbesetzt bleiben. Sicher ist die Affinität der CGT zu verschiedenen langen ($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucopyranosylketten unterschiedlich gross (siehe für α - und β -Amylasen Lit. 29 und 30). Nach den erhaltenen Befunden scheint sie zu den längeren Ketten grösser zu sein als zu Maltooligosacchariden (Exp. C).

(c) Der Zusatz von Cyclohexaamylose zu einem Transferansatz mit dem Substrat S_1 hat keinen Einfluss auf die initiale Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamylose, er beeinflusst aber sowohl die zeitabhängige Zunahme an dem Cyclodextrin wie auch den Substratumsatz. Im Experiment D pegelt sich die Menge an Cyclohexaamylose nach 10 min Inkubation auf einen konstant bleibenden Wert von 13,5 mM, im Experiment E auf einen solchen von 19,4 mM ein. Der Zeitumsatz des Substrates erfolgt in beiden Experimenten signifikant langsamer. Diese Befunde sprechen dafür, daß die Abnahme der Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamylose mit dem Substrat S_1 ihre Ursache in der Annäherung an das Gleichgewicht der Reaktion (I) zwischen dem Cyclodextrin und den längeren ($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucopyranosylketten hat*. In der Tat besteht eine Proportionalität zwischen der Substratkonzentration und der maximal gebildeten Menge an Cyclohexaamylose: Die Verhältnisse (Substrat)/(Cyclohexaamylose_{max}) ergeben im Bereich der Anfangskonzentrationen des Substrates zwischen 3 und 13 mM jeweils Werte um 0,67.

Nach French *et al.*³ kann Cyclohexaamylose in Gegenwart von Toluol oder 1,1,2-Trichloräthan annähernd vollständig in Cycloheptaamylose übergeführt werden. Bei diesen sekundären Transferreaktionen sollen die linearen Transferprodukte als Akzeptoren für die Kupplungsreaktion (I) dienen. Die im Verlauf der Langzeitinkubation unserer Transferansätze ohne Clathratbildner bzw. mit Toluol festzustellende Abnahme an Cyclohexaamylose ist grösser als die Zunahme an Cyclohepta- bzw. Cyclooctaamylose. Im Verlauf von 2 h Inkubation erhöht sich stattdessen der Gehalt an den in 60 % Methanol unlöslichen ($1 \rightarrow 4$)- α -D-Glucopyranosylketten (mit allerdings kleineren P_n -Werten). Da die Menge an längeren Ketten in dem Ansatz mit 1,1,2-Trichloräthan stark abgenommen hat, ist deren Zunahme in den Ansätzen ohne Clathratbildner bzw. mit Toluol nur durch Rückreaktion von Cyclohexaamylose nach (I) und entsprechender Disproportionierung der "Kupplungsprodukte" nach (2) zu erklären.

In dem 1,1,2-Trichloräthan-haltigen Ansatz erfolgt die Rückreaktion erst in dem letzten Zeitintervall zwischen 6 und 20 h Inkubation. Die Löslichkeit des 1,1,2-Trichloräthan-Clathrats von Cyclohexaamylose beträgt 2,6 g/L (2,44 mM), es ist daher nicht einzusehen, warum diese Konzentration an löslichem Cyclohexaamylose-Clathrat eine Rückreaktion nach (I) zunächst nicht erlaubt. Die Röntgenstruktur-

*Es wird die Frage zu prüfen sein, ob die abnehmende Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamylose nicht wenigstens teilweise auf einer Produkthemmung im Sinne einer kompetitiven Hemmung durch das Cyclodextrin selbst beruht: Berechnet man nach beliebigen Inkubationszeiten t die bei (S_1) zu bestimmende Bildungsgeschwindigkeit von Cyclohexaamylose auf die Anfangskonzentration des Substrates (S) und trägt nach Dixon³¹ $1/v_t$ (berechnet) gegen (Cyclohexaamylose_t) auf, so erhält man für die Substratkonzentrationen von 9, 11 und 16 mM jeweils Gerade, die sich im 2. Quadranten in der Höhe von $1/V$ schneiden.

TABELLE IV

BILDUNGSGESCHWINDIGKEITEN VON CYCLOHEPTA- UND CYCLOOCTAAMYLOSE IM VERLAUF DER LANGZEIT-INKUBATIONEN MIT DEM SUBSTRAT S₁ (ANFANGSKONZENTRATION 16 mM) IN ABWESENHEIT SOWIE IN GEGENWART DER CLATHRATBILDNER TOLUOL BZW. 1,1,2-TRICHLORÄTHAN^a

Inkubationszeit (h)	$v_{(\text{Cycloheptaamyllose})}$ (mkat·kg ⁻¹ Protein)		$v_{(\text{Cyclooctaamyllose})}$ (mkat·kg ⁻¹ Protein)	
	Plus Toluol	Plus 1,1,2-Trichloräthan	Plus Toluol	Plus 1,1,2-Trichloräthan
1	17,9	26,2	3,6	2,4
2	7,6	16,6	6,9	3,2
6	6,8	8,8	4,5	2,4
20				0,44

^aFür die Aufarbeitung der Transferansätze siehe Zit. 1. Weitere Erläuterungen im Text.

analyse von Cyclohexaamyllose-Hexahydrat ergibt, daß die 6 Glucopyranosylreste des Rings nicht äquivalent sind: Ein Glucopyranosylrest ist so rotiert, daß er annähernd normal zur Achse des Cyclodextrintritorus orientiert ist³². Die dadurch bedingte "Verdrehung" des Cyclodextrinmoleküls verschwindet, wenn ein Einschluskomplex gebildet wird. Aufgrund der vorgeschlagenen Struktur von Cyclohexaamyllose-Hexahydrat sollte die enzymatische Spaltung einer (1→4)- α -D-glucosidischen Bindung nur an diesem rotierten Glucopyranosylrest möglich sein. Das Cyclohexaamyllose-1,1,2-Trichloräthan-Clathrat dagegen sollte von der CGT nicht angreifbar sein. Die enzymatische Reaktion kann aber dann in Gang kommen, wenn Cyclodextrinmoleküle im Verlauf der Langzeitinkubation die eingeschlossene Verbindung verlieren.

Die Zyklisierungsreaktionen zu Cyclohepta- und Cyclooctaamyllose verlaufen, verglichen mit der zu Cyclohexaamyllose, extrem langsam (Tab. IV). Diese niedrigen Bildungsgeschwindigkeiten, die für Cycloheptaamyllose maximal 1/300, für Cyclooctaamyllose weniger als 1/1000 der für Cyclohexaamyllose ermittelten Werte betragen, berechtigen zu dem Schluss, daß es sich bei der Zyklisierung zu den höheren Cyclodextrinen um "Fehler" des Enzyms handelt, die im Verlauf der Langzeitinkubation dadurch relevant werden, daß die höheren Cyclodextrine nicht oder nur sehr langsam an den Kupplungsreaktionen teilnehmen (siehe dazu Zit. 1 und 4).

DANK

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden teilweise durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (Be 789/1).

LITERATUR

- 1 H. BENDER, *Carbohydr. Res.*, 65 (1978) 85–97.
- 2 F. CRAMER UND D. STEINLE, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 595 (1955) 81–100.
- 3 D. FRENCH, M. L. LEVINE, J. H. PAZUR UND E. NORBERG, *J. Am. Chem. Soc.*, 71 (1949) 353–356.
- 4 D. FRENCH, M. L. LEVINE, E. NORBERG, P. NORDIN, J. H. PAZUR UND G. M. WILD, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 2387–2390.
- 5 H. BENDER, *Arch. Microbiol.*, 113 (1977) 49–56.
- 6 D. FRENCH, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 12 (1957) 189–260.
- 7 E. NORBERG UND D. FRENCH, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 1202–1205.
- 8 J. A. DEPINTO UND L. L. CAMPBELL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 125 (1968) 253–258.
- 9 N. NAKAMURA UND K. HORIKOSHI, *Agric. Biol. Chem.*, 40 (1976) 1647–1648.
- 10 C. F. CORI, *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 4 (1945) 226.
- 11 K. MYRBÄCK UND L. G. GJÖRLING, *Ark. Kem. Mineral. Geol., Ser. A*, 20 (1945) 1–13.
- 12 M. B. SENIOR UND E. HAMORI, *Biopolymers*, 12 (1973) 65–78.
- 13 J. SZETTLI UND S. AUGUSTAT, *Stärke*, 18 (1966) 38–42.
- 14 Q. T. NGUYEN, P. APTEL UND J. NEEL, *Biopolymers*, 15 (1976) 2097–2100.
- 15 B. PFANNEMÜLLER, H. MAYERHOFER UND R. C. SCHULZ, *Biopolymers*, 10 (1971) 243–361.
- 16 D. FRENCH, *MTB Int. Rev. Sci., Org. Chem., Ser. Five, Carbohydr.* (1975) 267–335.
- 17 H. BENDER, *Arch. Microbiol.*, 111 (1977) 271–282.
- 18 J. A. THOMA UND L. STEWART, in R. L. WHISTLER UND E. F. PASCHALL (Eds.), *Starch: Chemistry and Technology*, Vol. I, Academic Press, New York, 1965, ss. 209–249.
- 19 R. G. SPIRO, *Methods Enzymol.*, 8 (1966) 3–36.
- 20 F. J. VILES UND L. SILVERMAN, *Anal. Chem.*, 21 (1949) 950–953.
- 21 N. NELSON, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 375–380.
- 22 Z. GUNJA-SMITH, J. J. MARSHALL UND E. E. SMITH, *FEBS Lett.*, 13 (1971) 309–311.
- 23 J. B. LLOYD UND W. J. WHELAN, *Anal. Biochem.*, 30 (1969) 467–470.
- 24 Z. GUNJA-SMITH, J. J. MARSHALL, C. MERCIER, E. E. SMITH UND W. J. WHELAN, *FEBS Lett.*, 12 (1970) 101–104.
- 25 W. BANKS UND C. T. GREENWOOD, *Carbohydr. Res.*, 6 (1968) 177–183.
- 26 J. M. BAILEY UND W. J. WHELAN, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 969–973.
- 27 J. A. THOMA UND D. FRENCH, *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 4144–4147.
- 28 H. LINEWEAVER UND D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658–666.
- 29 D. FRENCH UND R. W. YOUNGQUIST, *Stärke*, 12 (1963) 425–431.
- 30 J. A. THOMA, G. V. K. RAO, C. BROTHERS UND J. SPRADLIN, *J. Biol. Chem.*, 246 (1971) 5621–5635.
- 31 M. DIXON, *Biochem. J.*, 55 (1953) 170–171.
- 32 W. SÄNGER, M. NOLTEMEYER, P. C. MANOR, B. HINGERTY UND B. KLAR, *Bioorg. Chem.*, 5 (1976) 187–195.