

PHOSPHOROLYTISCHE SYNTHESE VON NIEDERMOLEKULAREN AMYLOSEN MIT MODIFIZIERTEN ENDGRUPPEN

CLAUDIA NIEMANN*, ROLF NUCK†, BEATE PFANNEMÜLLER‡ UND WOLFRAM SAENGER*,§

**Institut für Kristallographie, Freie Universität Berlin, Takustr. 6, D-1000 Berlin 33 (Bundesrepublik Deutschland).* †*Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin, Arnimallee 22, D-1000 Berlin 33 (Bundesrepublik Deutschland).* ‡*Institut für Makromolekulare Chemie, Albert-Ludwigs-Universität, Stefan-Meier-Str. 31, D-7800 Freiburg i.Br. (Bundesrepublik Deutschland)*

(Eingegangen am 27. Dezember 1988; angenommen in revidierter Form am 13. Juli 1989)

ABSTRACT

The preparation of low-molecular-weight amyloses with modified terminal groups in the range d.p. 10–20 was achieved by enzymic synthesis using phosphorylase from a potato crude extract. 4-Nitrophenyl α -D-maltooligosides with a minimum chain length of five D-glucose units served as primers, providing good yields in a 10–12-fold molar excess of α -D-glucopyranosyl phosphate. Up to 89% conversion was obtained after 4 h at pH 5.8, 40°, and a phosphorylase activity of 30 units. The reaction products were analyzed by h.p.l.c. Elution profiles always revealed oligomers shorter than the primer. The preferred appearance of the maltotriose after incubation of the primer with the enzyme crude extract indicated the presence of a disproportionation enzyme.

ZUSAMMENFASSUNG

Niedermolekulare Amylosen mit modifizierten Endgruppen im Bereich D.p. 10–20 wurden durch enzymatische Synthese mit Phosphorylase aus einem Kartoffelrohextrakt dargestellt. Als Starter dienten 4-Nitrophenyl- α -D-maltooligomere, die ab einer Länge von fünf D-Glucoseeinheiten und einem 10–12fachen molaren Überschuß von α -D-Glucopyranosylphosphat nach 4 h bei pH 5.8, 40° und einer Phosphorylase-Aktivität von 30 Einheiten bis zu 89% Umsatz ergaben. Die Reaktionsprodukte wurden mittels H.p.l.c. analysiert. Das Auftreten von Oligomeren, die kürzer waren als das Startermolekül, und die bevorzugte Bildung des Maltotriosids nach Inkubation des Starters mit dem Rohextrakt deutet auf Verunreinigung mit einem Disproportionierungs-Enzym hin.

EINLEITUNG

Für die Untersuchung der Struktur von Amylose und Strukturbereichen im

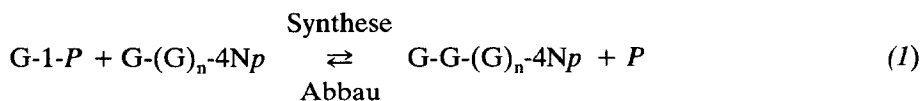
§Korrespondenzautor.

Amylopektin benötigt man Modellsubstanzen. Maltooligosaccharide mit definierter Kettenlänge und Polymerisationsgraden (D.p.) von 10–20 erscheinen uns für diese Zwecke besonders geeignet.

Sie wurden bisher meist aus Abbauprodukten von Amylose, Amylopektin oder Glycogen gewonnen. Entweder baute man Amylose säurehydrolytisch¹ oder mit Alpha-Amylase enzymatisch ab². Aus letzterem Verfahren erhält man, z.B. mit Alpha-Amylase aus *Bacillus subtilis*³, überwiegend kurzkettige Oligomerengemische im Bereich von D.p. 3–8. Weiterhin wurden Amylopektin und Glycogen mit entzweigenden Enzymen behandelt^{4,5}. Dieser Prozeß liefert, neben höhermolekularen Produkten, Gemische mit der gewünschten Oligomerenverteilung, deren Zusammensetzung durch die Länge der äußeren Zweige des Ausgangsmaterials vorgegeben ist.

Unser Ziel ist die Herstellung von linearen Maltooligomeren mit definierter Kettenlänge zur Strukturaufklärung mittels Einkristall-Röntgendiffraktion. Während nicht modifizierte Maltooligomere bisher nur Mikrokristalle ergaben, die mit Röntgenpulverdiffraktion und Elektronendiffraktion untersucht wurden^{6,7}, stellten wir fest, daß die mit einer 4-Nitrophenyl-Gruppe am reduzierenden Ende modifizierten und damit gegen Mutarotation geschützten Maltooligosaccharide erfolversprechender sind. Die Kristallstrukturanalyse des 4-Nitrophenyl- α -D-maltohexaosids im Komplex mit Polyjodid wurde berichtet⁸; das Oktamer konnte kürzlich in einer für die Röntgeneinkristalldiffraktion geeigneten Form kristallisiert werden.

Die Herstellung der 4-Nitrophenyl- α -D-maltooligosaccharide kann prinzipiell durch Umsetzung von Cyclodextrinen und 4-Nitrophenylglucosid unter Einwirkung von (1 \rightarrow 4)- α -D-Glucan-4-glucosyltransferase (EC 2.4.1.19) erfolgen⁹. Einfacher erschien uns jedoch die phosphorolytische Synthese, die zur Gewinnung von höhermolekularen Amylosen, auch mit modifizierten Endgruppen, bereits untersucht wurde^{10,11}. Sie lieferte in Umkehrung der physiologischen Reaktion, bei der Polysaccharid-Abbau katalysiert wird, Produkte mit relativ einheitlicher Kettenlänge (Gl. 1).



G-1-P, α -D-Glucopyranosylphosphat; 4Np, 4-Nitrophenyl; G, α -D-Glucopyranosylrest; P, anorg. Phosphat; $n \geq 4$

Zur Darstellung niedermolekularer Amylosen mit modifizierten Endgruppen wurde dieses Verfahren bisher nicht verwendet. Um den Syntheseverlauf in Bezug auf einen größtmöglichen Umsatz zu beeinflussen, war es notwendig, das Verhalten der Kartoffelphosphorylase (EC 2.4.1.1) bei der Synthese der 4-Nitrophenyl- α -D-maltooligosaccharide anhand verschiedener Parameter wie pH-Wert, Temperatur

und Enzymkonzentration zu untersuchen. Weiterhin wird über die Kettenlängen-Verteilung der erhaltenen Produkte im angestrebten D.p.-Bereich und bisher nicht beobachtete enzymatisch katalysierte Disproportionierungserscheinungen des Startermoleküls berichtet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Für die phosphorolytische Synthese von 4-Nitrophenyl- α -D-maltooligosacchariden erwies sich ein Starter mit weniger als fünf D-Glucoseeinheiten pro Molekül als nicht geeignet. Wie in früheren Arbeiten festgestellt wurde, wirkt sich die Modifizierung am reduzierenden Ende des Moleküls auf die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes in der Weise aus, daß sich z.B. Aldonamido- α -D-maltotetraosid kinetisch wie eine unsubstituierte Maltotriose verhält^{10,11}. Eine Probesynthese mit 4-Nitrophenyl- α -D-maltotetraosid als Starter bestätigte diese Ergebnisse. Die Reaktionsgeschwindigkeit war anfangs deutlich langsamer, der Umsatz lag nur bei 34% des eingesetzten α -D-Glucopyranosylphosphats, und eine Analyse der Reaktionsprodukte zeigte die charakteristische Verteilung der Oligomeren analog zur Synthese mit Maltotriose¹⁰. Um zu besseren Ausbeuten an höheren Oligomeren zu gelangen, mußte das 4-Nitrophenyl- α -D-maltopentaosid eingesetzt werden.

Der von uns hergestellte und für die Reaktion geeignet erscheinende Rohextrakt der Kartoffelphosphorylase hatte eine Aktivität von 10 Einheiten/mL und enthielt nachweislich keine Alpha-Amylase¹².

In der Literatur differieren die Angaben über einen optimalen pH-Wert für die phosphorolytische Synthese. Lee¹³ gibt einen pH-Wert von 6.6, Holló und Mitarbeiter¹⁴ von etwa 6.0 an. Letztere ermittelten auch, daß erhöhte Temperaturen und Enzymkonzentrationen eine hohe Anfangsgeschwindigkeit bewirken, und daß bei pH 6.0 etwa 90% des eingesetzten α -D-Glucopyranosylphosphats umgesetzt werden¹⁴.

Da wir auf den Einsatz von Citratpuffer verzichteten, um die Trennung der anfallenden Syntheseprodukte nicht durch erhöhte Salzkonzentrationen zusätzlich zu erschweren, mußten die Reaktionsparameter pH-Wert, Temperatur und Enzymkonzentration unter den von uns gewählten Bedingungen in Bezug auf größtmöglichen Umsatz in kurzer Zeit neu optimiert werden. Dazu wurden zunächst Probereaktionen mit geringen Mengen Starter durchgeführt. Aus Tabelle I ist ersichtlich, daß beim Einsatz von 2.4 μ mol 4-Nitrophenyl- α -D-maltopentaosid, 5.3 mmol α -D-Glucopyranosylphosphat und 30 Einheiten Phosphorylase bei erhöhten Temperaturen nach 2 h bereits ein relativ hoher Umsatz auch ohne Konstanthalten des pH-Werts zu erreichen ist (Abb. 1).

Die Gleichgewichtslage der Reaktion ist, wie Hanes und Maskell im Jahre 1942 bereits feststellte¹⁵, stark abhängig vom Verhältnis des entstehenden anorganischen Phosphats zum eingesetzten organisch gebundenen Phosphat. Dieses Verhältnis wird bei niedrigerem pH-Wert zugunsten der Entstehung höherer

TABELLE I

EINFLUß DER TEMPERATUR, PHOSPHORYLASEAKTIVITÄT UND pH-WERT AUF DEN UMSATZ BEI DER PHOSPHOROLYTISCHEN SYNTHESE^a

Temperatur (Grad)	Phosphorylase (mL)	pH Start	pH nach 3 h	Umsatz (%)
20	2	6.20		43.4
20	2	5.90	6.15	48.3
20	1	6.20	6.52	28.8
20	3	6.33	6.64	53.8
25	3	5.88	6.23	65.1
37	3	5.92	6.25 (2 h)	85.9

^a4-Nitrophenyl- α -D-maltopentaosid (2.4 μ mol) als Starter, α -D-Glucopyranosylphosphat (5.3 mmol) und Phosphorylase (Aktivität 10 Einheiten/mL). Umsatz ermittelt durch kolorimetrische Phosphatbestimmung.

Mengen Orthophosphats verschoben. Das Verhältnis Hydrogenphosphat zu α -D-Glucopyranosylphosphat bleibt jedoch über einen pH-Bereich von 5.0 bis 7.0 konstant. So war ein pH-Optimum für einen größtmöglichen Umsatz zwischen pH 5.7 und 6.2 zu erwarten. Wir fanden dieses Optimum unter pH-Stat-Bedingungen bei einem pH-Wert von 5.8, einer Temperatur von 40° und der Phosphorylaseaktivität von 30 Einheiten pro Ansatz mit einem Umsatz von 89% (Tab. II).

Das molare Verhältnis von Monomer zu Starter wurde für die Darstellung von mit 4-Nitrophenylgruppen modifizierten niedermolekularen Amylosen im D.p.-Bereich 10–20 zunächst auf 10:1 gesetzt, um dadurch eine Oligomerenver-

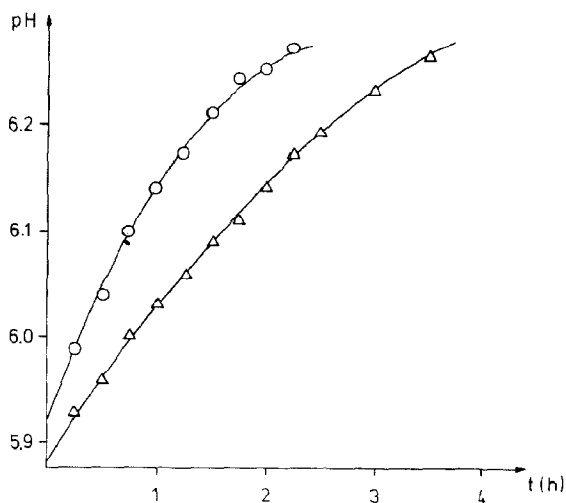


Abb. 1. Änderung des pH-Werts bei der phosphorolytischen Synthese ohne Pufferzusatz: 25° (Δ) und 37° (\circ). Bei erhöhter Temperatur verläuft die Reaktion deutlich schneller. Der Gleichgewichtszustand ist nach 2.5 h erreicht.

TABELLE II

OPTIMIERUNG VON TEMPERATUR UND pH-WERT BEI DER PHOSPHOROLYTISCHEN SYNTHESE^a

<i>Temperatur (Grad)</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Umsatz (%)</i>
37	5.7	81.2
37	5.8	85.3
40	5.8	89.2
45	5.8	89.3
37	5.9	83.4
40	5.9	85.4
37	6.0	81.6
40	6.0	83.9
37	6.1	80.0

^a4-Nitrophenyl- α -D-maltopentaosid (2.4 μ mol) als Starter, α -D-Glucopyranosylphosphat (5.3 mmol) als Monomer und Phosphorylasemenge von 30 Einheiten je Ansatz. Umsatz nach 4 h war ermittelt durch kolorimetrische Phosphatbestimmung.

teilung in dem gewünschten Bereich zu erhalten¹⁶. Nach 4 h bestimmten wir den Umsatz und brachen die Reaktion ab. Nach Entfernen des Proteins und Entsalzen des Lyophilisats untersuchten wir die erhaltenen Produkte mittels H.p.l.c.¹⁷.

Abbildung 2 zeigt ein typisches Oligomeregemisch nach einer Reaktion mit 84% Umsatz. Offensichtlich wird der angestrebte D.p.-Bereich durch die Synthese zugänglich. Bemerkenswert ist die relativ breite Verteilung, wobei das Maximum bei D.p. 9 liegt. Diese unerwartete Verbreiterung des Spektrums der auftretenden Oligomeren und besonders die Anwesenheit von Spezies unter D.p. 5 veranlaßte uns zu weiteren Untersuchungen. Durch Erhöhung der eingesetzten Menge α -D-Glucopyranosylphosphat (12:1) und der Phosphorylaseaktivität (60 Einheiten) war eine Verschiebung des Maximums in Richtung höherer D.p. zu erreichen (Abb. 3). Eine signifikant engere Verteilung war jedoch nicht zu beobachten. Deshalb lag die Vermutung nahe, daß im verwendeten Phosphorylase-Rohextrakt eine Fremdaktivität vorhanden war, die einen unerwünschten Einfluß auf das Ergebnis der phosphorolytischen Synthese hatte.

Diese Annahme bestätigte sich nach Inkubationsversuchen des Enzyms mit 4-Nitrophenyl- α -D-maltopentaosid ohne Zusatz von α -D-Glucopyranosylphosphat. Nach 24 h bei pH 5.8 und Raumtemperatur war der ursprünglich hochreine Starter deutlich disproportioniert und die H.p.l.c.-Analyse zeigte eine Oligomerenverteilung mit einem Maximum bei D.p. 3 (Abb. 4). Da das ebenfalls im Kartoffelsaft vorhandene D-Enzym als Ursache für diese Disproportionierung in Frage kam, und dessen pH-Optimum mit pH 6.7 angegeben wird¹⁸, inkubierten wir den Starter mit dem Enzymextrakt bei diesem pH-Wert unter den o.g. Bedingungen. Das

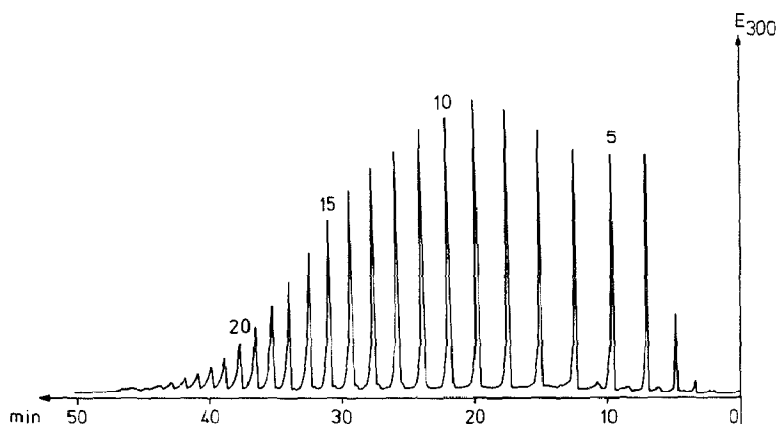


Abb. 2. Reaktionsprodukte der phosphorolytischen Synthese 4-Nitrophenyl-modifizierter niedermolekularer Amylosen (H.p.l.c. Bedingungen s. Zit. 17). 4-Nitrophenyl- α -D-maltopentaosid als Starter, α -D-Glucopyranosylphosphat als Monomer und Monomer-Starter-Verhältnis 10:1. Die Zahlen bezeichnen den Polymerisationsgrad (D.p.) der Oligomeren.

Ergebnis dieses Versuchs zeigt das H.p.l.c.-Elutionsprofil in Abb. 5. Eine noch deutlichere Disproportionierung mit Spezies bis D.p. 15 war zu beobachten, wobei das Maximum wiederum bei D.p. 3 liegt.

Das Muster der Oligomerenverteilung stimmt mit der von Jones und Whelan¹⁹ gefundenen Verteilung der Produkte aus Reaktionen von radioaktiv mar-

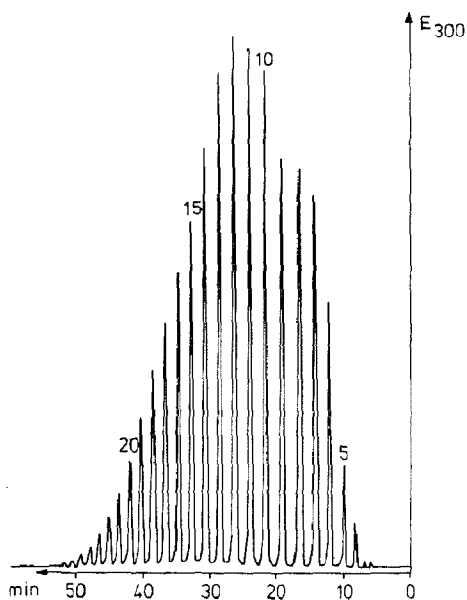


Abb. 3. H.p.l.c.-Elutionsprofil der Reaktionsprodukte einer Synthese mit einem Monomer-Starter-Verhältnis von 12:1 und erhöhter Phosphorylaseaktivität.

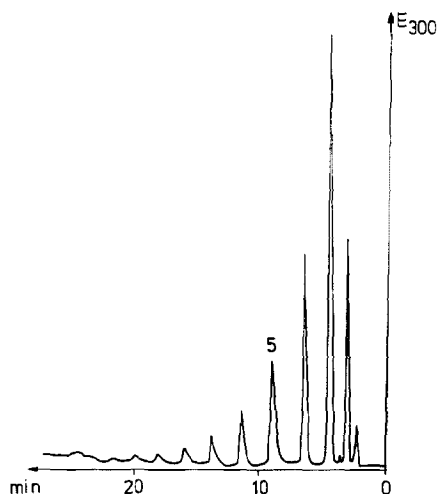


Abb. 4. Oligomerenverteilung nach der Inkubation des 4-Nitrophenyl- α -D-maltopentaosids mit dem Rohextrakt der Kartoffelphosphorylase bei pH 5.8.

kierten Maltooligosacchariden mit D-Enzym (EC 2.4.1.25) überein. Für dieses Enzym existieren auf Grund seiner Spezifität sogenannte "verbotene" Bindungen (Schema 1), die nicht gespalten werden. Dies sind die glucosidische Bindung am nichtreduzierenden und die vorletzte Bindung vor dem reduzierenden Ende des Moleküls, sodaß ein Substrat mit nur drei glucosidischen Bindungen nicht vom D-Enzym gespalten wird. Versuche mit dem von uns hergestellten Phosphorylase-Rohextrakt an 4-Nitrophenyl- α -D-maltosid, -maltotriosid und -maltotetraosid bestätigten, daß tatsächlich dieser Disproportionierungsmechanismus auftrat. Das

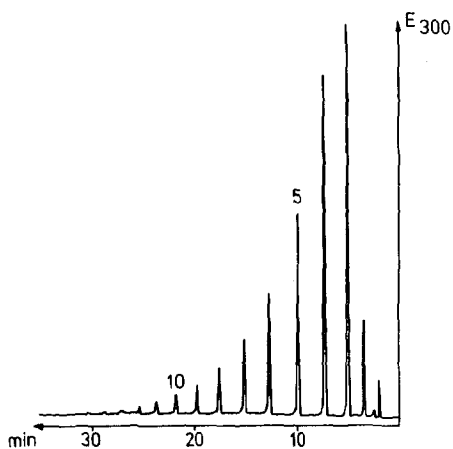
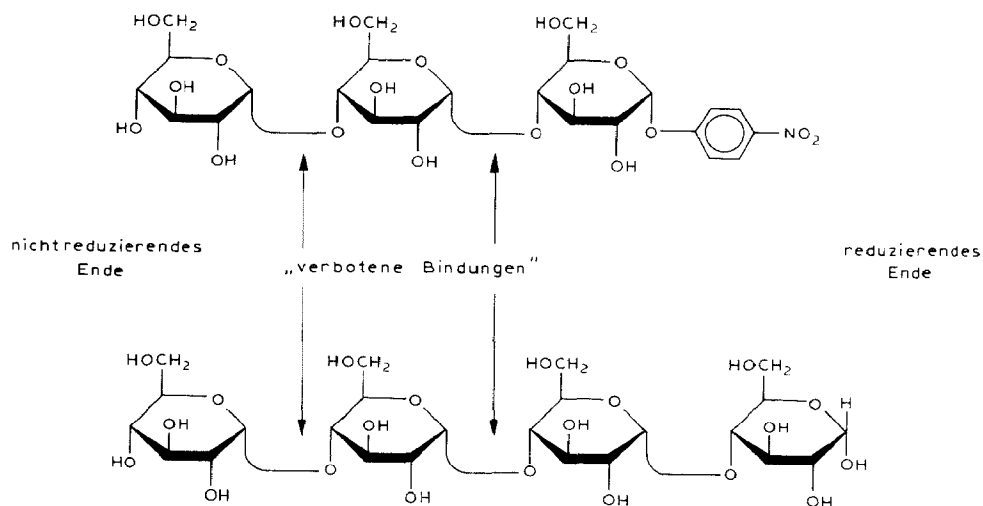


Abb. 5. Verteilung der Oligomeren nach der Inkubation des Starters mit dem Enzym-Extrakt bei pH 6.7.



Schema 1. „Verbotene“ Bindungen für das D-Enzym am 4-Nitrophenyl- α -D-maltotriosid und an der Maltotetraose¹⁹.

Maltosid und das Tetraosid zeigten deutliche Disproportionierung, das Triosid wurde nur schwach angegriffen.

Anhand dieser Untersuchungen kann die nicht vorhergesehene breite Oligomerenverteilung sowie die Verschiebung des D.p.-Maximums erklärt werden. Ein höherer Reinheitsgrad der Kartoffelphosphorylase müßte diese unerwünschten Erscheinungen weitgehend unterdrücken und es sollte möglich sein, die Oligomerenverteilung im gewünschten D.p.-Bereich enger zu gestalten. Dies und auch die Gewinnung der 4-Nitrophenyl- α -D-maltooligosaccharide mit definierter Kettenlänge im präparativen Maßstab werden der Gegenstand weiterführender Arbeiten sein.

EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeine Methoden. — Die Herstellung eines für die Synthese geeigneten Rohextrakts der Kartoffelphosphorylase erfolgte nach Literaturangaben²⁰, ebenso die Bestimmung der Enzymaktivität²¹. Diejenige Menge Enzym, die 1 μ mol Phosphat \cdot min⁻¹ bei 25° und pH 6.0 freisetzt, wird als eine Einheit definiert. Der Extrakt wurde auf eventuell vorhandene α -Amylaseaktivität geprüft¹².

Standardansätze zur Optimierung von Temperatur, pH-Wert und Phosphorylaseaktivität. — 4-Nitrophenyl- α -D-maltopentaosid (2.4 μ mol, 2 mg; Boehringer Mannheim GmbH, D-6800 Mannheim 31, B.R.D.) wurden mit Dinatrium- α -D-Glucopyranosylphosphat (5.3 mmol, 2 g) (Boehringer) und verschiedenen Phosphorylasemengen in einem Endvolumen von 30 mL Wasser unter Rühren bei verschiedenen Temperaturen und pH-Wert inkubiert und der Umsatz nach 2 h bzw. 3 h bestimmt.

pH-Wert und Temperaturkontrolle. — Der pH-Wert wurde elektronisch mit einem Meßsystem Glaselektrode–Kalomelektrode (Amagruss) gemessen und mit 2M Essigsäure eingestellt. Unter pH-Stat-Bedingungen führte eine durch einen Titrator TTT1 gesteuerte Autobürette ABU 13 (Radiometer Kopenhagen) die Säure entsprechend dem Reaktionsverlauf zu. Das Reaktionsgefäß wurde auf $\pm 0.1^\circ$ genau thermostatiert (Julabo, C-5B).

Umsatzbestimmung. — Das bei der Reaktion freiwerdende Phosphat wurde als Molybdatophosphat-Komplex²¹ kolorimetrisch bei 689 nm (Spektrophotometer DU 6, Beckmann) bestimmt und der Umsatz in Bezug auf die eingesetzte Menge α -D-Glucopyranosylphosphat ermittelt.

Phosphorolytische Synthese der 4-Nitrophenyl- α -D-maltooligosaccharide im Bereich D.p. 10–20. — 4-Nitrophenyl- α -D-maltopentaosid (0.53 mmol, 500 mg) und Dinatrium- α -D-Glucopyranosylphosphat (5.3 bzw. 6.3 mmol; 2 g bzw. 2.68 g), werden in Wasser mit Kartoffelphosphorylase (30–60 Einheiten) in einem Endvolumen von 35 mL bei 40° und einem pH-Wert von 5.8 für 4 h inkubiert. Das Protein wird koaguliert (100° , 15 min), das Filtrat lyophilisiert, über Bio-Gel P-2 (200–400 mesh; Bio-Rad Labs) entsalzt und die Kettenlängenverteilung mittels H.p.l.c. an einer aminierten Kieselgel-Phase (Hypersil APS-2, Shandon) mit einem linear absteigenden Gradienten Acetonitril–Wasser bestimmt¹⁷.

Disproportionierungsreaktion im System Starter–Enzym. — 4-Nitrophenyl- α -D-maltosid, -maltotriosid, -maltotetraosid und -maltopentaosid (je 10 mg; Boehringer) werden 24 h bei pH 5.8 bzw. 6.7 mit Phosphorylase (30 Einheiten) in Wasser (30 mL) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abtrennen des Proteins (s.o.) wird das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt und mit Hilfe der H.p.l.c. untersucht.

DANK

Die Autoren danken Christine Arlott für vorzügliche technische Hilfe und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Az. Sa 196/12-2) und dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

LITERATUR

- 1 S. KIKUMOTO UND D. FRENCH, *Denpun Kogyo Gakkaishi*, 30 (1983) 69–75.
- 2 C. T. GREENWOOD UND E. A. MILNE, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 23 (1968) 281–366.
- 3 W. EMMERLING UND B. PFANNEMÜLLER, *Carbohydr. Res.*, 86 (1980) 321–324.
- 4 D. R. LINEBACK, *Denpun Kogyo Gakkaishi*, 33 (1986) 80–88.
- 5 M. J. GIDLEY UND P. V. BULPIN, *Carbohydr. Res.*, 161 (1987) 291–300.
- 6 B. PFANNEMÜLLER, *Int. J. Biol. Macromol.*, 9 (1987) 105–108.
- 7 A. IMBERTY, H. CANZY, S. PEREZ, A. BULÉON UND V. TRAN, *J. Mol. Biol.*, 201 (1988) 365–378.
- 8 W. HINRICHS, G. BUTTNER, M. STEIFA, C. BETZEL, V. ZABEL, B. PFANNEMÜLLER UND W. SAENGER, *Science*, 238 (1987) 205–208.
- 9 K. WALLENFELS, D. FÖLDI, H. NIERMANN, H. BENDER UND D. LINDNER, *Carbohydr. Res.*, 61 (1978) 359–368.
- 10 B. PFANNEMÜLLER UND W. BURCHARD, *Makromol. Chem.*, 121 (1969) 1.

- 11 W. EMMERLING UND B. PFANNEMÜLLER, in J. J. MARSHALL (Hrsg.), *Mechanism of Saccharide Polymerisation and Depolymerisation*, Academic Press, New York, 1980, SS. 413–420.
- 12 B. KLEIN, J. A. FOREMAN AND R. L. SEARCY, *Anal. Biochem.*, 31 (1969) 412.
- 13 G. P. LEE, *Biochim. Biophys. Acta*, 43 (1960) 18–25.
- 14 J. HOLLÓ, E. LÁSZLÓ UND A. HOSCHKE, *Stärke/Starch*, 17 (1965) 377–381.
- 15 C. S. HANES UND E. J. MASKELL, *Biochem. J.*, 36 (1942) 76–79.
- 16 B. PFANNEMÜLLER, *Naturwissenschaften*, 62 (1975) 231–235.
- 17 C. NIEMANN UND R. NUCK, *J. Chromatogr.*, in Vorbereitung.
- 18 W. J. WHELAN, in W. RUHLAND (Hrsg.), *Starch and Similar Polysaccharides, Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. 6, Springer Verlag, Berlin, 1958, SS. 154–240.
- 19 G. JONES UND W. J. WHELAN, *Carbohydr. Res.*, 9 (1969) 483–490.
- 20 G. ZIEGAST UND B. PFANNEMÜLLER, *Carbohydr. Res.*, 160 (1987) 185–204.
- 21 E. HUSEMANN, B. FRITZ, R. LIPPERT, B. PFANNEMÜLLER UND E. SCHUPP, *Makromol. Chem.*, 26 (1958) 181–198.