

## **Stufenweises Prüfschema für Zuckeraustauschstoffe – Vorprüfung mittels Enzymen. 1. $\alpha$ -Glucosidase aus Hefe**

**G. Siebert und S. C. Ziesenitz**

Abteilung für experimentelle Zahnheilkunde, Universität Würzburg

*Zusammenfassung:*  $\alpha$ -Glucosidase aus Hefe wird an Hand ihrer katalytischen Leistung unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert. Michaelis-Konstanten und Maximalgeschwindigkeiten für 7 Disaccharide vom Glucosyl-fructose- oder Glucosyl-glucose-Typ, 4 Disaccharidalkohole und 2 Gemische aus je 2 Disaccharidalkoholen werden angegeben. Reduktion einer Carbonylfunktion ist von geringerem Einfluß auf die Substrateigenschaften als die Lage der Glykosidbindung; hieraus werden Eignungsparameter für potentielle Zuckeraustauschstoffe abgeleitet.

*Summary:*  $\alpha$ -Glucosidase from yeast was checked for its catalytic potency under a variety of experimental conditions. Michaelis constants and maximal velocities are reported for 7 disaccharides of the glucosyl-fructosyl or glucosyl-glucosyl type, 4 disaccharide alcohols, and 2 mixtures of each 2 disaccharide alcohols. Reduction of a carbonyl group is of less importance for the substrate properties than the type of the glycoside bond; consequences for the suitability of potential sugar substitutes are derived.

*Schlüsselwörter:* Glucosidase, Maltase, Zuckeraustauschstoff, Palatinit®, Trehalulose

### **Einleitung**

Einsatzgebiete für Zuckeraustauschstoffe sind entweder nichtkariogene Süßwaren und Schokoladewaren oder kalorienreduzierte Lebensmittel oder beide, ferner ebenso diätetische Lebensmittel für Diabetiker, je nach Substanz.

Zuckeraustauschstoffe der zweiten Generation sind u. a. durch das Vorhandensein von Glykosidbindungen gekennzeichnet (1). Eine Variation der Lage der Glykosidbindungen ist ein strukturelles Element, welches im allgemeinen (Palatinit® (2); Coupling sugars (3); Neosugars (4)), jedoch nicht immer (Maltit (5); Lycasin® mit erhaltener  $\alpha(1\rightarrow4)$ -Bindung; Lactit, T. H. Grenby, pers. Mitt.) die Eignung der jeweiligen Substanzen als Zuckeraustauschstoff wesentlich bestimmt.

Prüfmethode auf Kariogenität (6) und auf energetische Verwertung (7) sind gut entwickelt, jedoch so aufwendig an Zeit und auch Material, daß Schnellmethoden zur Vorprüfung erforderlich sind, die ein stufenweises Vorgehen erlauben. In den letzten Jahren haben wir uns mit der Entwicklung von In-vitro-Vorprüfungen befaßt. Während die Schnellmethode der anaeroben Vergärung von Prüfsubstanzen durch Mundbakterien bereits

beschrieben ist (8), werden in dieser und den nachfolgenden Arbeiten (9, 10) Carbohydrasen zur raschen Charakterisierung von potentiellen Zuckeraustauschstoffen verwendet. Diese Mitteilung betrifft  $\alpha$ -Glucosidase aus Hefe.

## Material und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Disaccharide und Polyole entstammen folgenden Quellen: D-Glucosyl- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 1)-D-fructose sowie deren Reduktionsprodukt, ein Gemisch aus D-Glucosyl- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 1)-D-glucit und D-Glucosyl- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 1)-D-mannit, ferner Palatinit<sup>®</sup>, sowie dessen Komponenten D-Glucosyl- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 1)-D-mannit und D-Glucosyl- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)-D-glucit, von Dr. Schiweck, Neuoffstein; Saccharose und Maltose von Merck, Darmstadt; Turanose und Isomaltose von Sigma, St. Louis; Leucrose von Dr. Schwengers, Dormagen; Isomaltulose (Palatinose<sup>®</sup>) von Dr. Sträter, Mannheim; Maltit von Serva, Heidelberg.

$\alpha$ -Glucosidase aus Hefe wurde von Boehringer, Mannheim, bezogen, teils als Suspension in Ammoniumsulfat, gelegentlich auch „mit Glycerin stabilisiert“. Zur Entsalzung erwies sich eine kurze scharfe Zentrifugation in der Kühlzentrifuge mit nachfolgender, sorgfältiger Dekantierung und Auswischen der inneren Röhrchenwand über dem Sediment als gleichwertig mit einer Entsalzung an einer Sephadex-G-25-Säule. Der mittels Zentrifugation erhaltene Bodensatz wurde im Inkubationspuffer 0,1 M Maleat, pH 6,0 gelöst. Die zur Inkubation benötigten Enzymmengen wurden ermittelt, nachdem jeweils der Proteingehalt nach Lowry et al. (11) festgestellt worden war, so daß vergleichbare Inkubationsansätze stets identische Mengen von  $\alpha$ -Glucosidase enthielten.

Zur Inkubation wurde nach Dahlqvist (12) vorgegangen. Nach Abbrechen der Enzymreaktion wurden freigesetzte Glucose (und wenn zutreffend, Fructose) enzymatisch mittels Glucose-6-phosphatdehydrogenase nach Standardvorschriften (13, 14) ermittelt. Bei jedem neuen Substrat wurden die Eichkurven für freie Glucose und Fructose auf Gültigkeit überprüft.

Zur Auswertung wurden nur Versuchsreihen herangezogen, bei denen jeweils Proportionalität zur Enzymmenge (2- bis 4fach variiert) und Proportionalität zur Inkubationszeit gewährleistet waren. Da für alle Angaben der Hydrolysegeschwindigkeiten stets auch die Michaelis-Konstanten ermittelt wurden, wurden die Hydrolyseraten als Maximalgeschwindigkeiten ausgedrückt. Die kinetische Auswertung wurde nach Lineweaver-Burk (15, 16) sowie – wenn anwendbar – nach Cornish-Bowden (17), nach Dixon (15, 16) und nach Hanes-Woolf (15, 16) vorgenommen. Nur wenn nach mindestens zwei Verfahren Kompatibilität bestand, wurden die Auswertungsergebnisse in die Tabellen aufgenommen.

## Ergebnisse

Die beiden unter Material und Methoden beschriebenen Entsalzungsverfahren sind mit den Standardsubstraten Maltose und Saccharose sowie mit Maltit verglichen worden (Tab. 1). Es ergibt sich, daß eine Teilentsalzung durch Zentrifugation ausreicht, um aktivitätsmindernde Effekte von Ammoniumsulfat zu eliminieren, da bei vollständiger Entsalzung nahezu identische spezifische Aktivitäten und  $k_m$ -Werte beobachtet werden wie nach Entsalzung durch Zentrifugation.

Vergleicht man teilentsaltzte  $\alpha$ -Glucosidase aus Hefe mit der in Glycerin stabilisierten Enzympräparation (Tab. 2), so liegen für das Glycerin enthaltende Enzym die Michaelis-Konstanten durchgängig höher, im Mittel der Disaccharide um das 2fache gegenüber dem teilentsalzten Enzym. Auch

Tab. 1.  $\alpha$ -Glucosidase aus Hefe<sup>1)</sup>.

Substrat	entsalzt über Sephadex G-25		entsalzt durch Zentrifugation	
	$k_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu$ mol/min $\times$ 1 mg Protein)%	$k_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu$ mol/min $\times$ 1 mg Protein)%
Saccharose <sup>2)</sup>	40	28	133	26
Maltose <sup>2)</sup>	33	21	100	21
Maltit <sup>3)</sup>	70	7	33	7

<sup>1)</sup> Boehringer, Mannheim<sup>2)</sup> Merck<sup>3)</sup> Serva

die Hydrolyseraten liegen höher; die Spezifität dagegen hat sich nicht verändert. Reduzierte Disaccharide (Disaccharidalkohole) der unteren Hälfte der Tabelle 2 verhalten sich im Prinzip wie Disaccharide, wenn sie auch bei Vergleich von Glycerin- und teilentsalzten Enzympräparationen etwas langsamer hydrolysiert werden. Die nachfolgenden Versuche sind alle mit teilentsalzter  $\alpha$ -Glucosidase unternommen werden.

Tabelle 3 enthält die kinetischen Angaben für die Spaltung von 7 Disacchariden sowie von 4 Disaccharidalkoholen und 2 Substanzgemischen. Mit erheblicher Geschwindigkeit gespalten werden Saccharose, Turanose und Maltose, ferner Maltit. Alle anderen Verbindungen sind nur geringfügig spaltbar. Bei den Michaelis-Konstanten fällt die geringe Affinität des Enzyms zu Maltit und Malbit® auf, die sich bei keiner anderen Substanz findet. Sieht man von Maltit ab, so hat die Carbonylreduktion zum Disac-

Tab. 2.  $\alpha$ -Glucosidase aus Hefe<sup>1)</sup>.

Substrat		$k_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu$ mol/min $\times$ 1 mg Protein) %
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 1) fru	Glucosylfructose	31	2,4
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ $\beta$ 2) fru	Saccharose	47	34,4
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3) fru	Turanose	36	36,2
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) glc	Maltose	83	43,7
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6) fru	Isomaltulose	31	1,4
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 1) gut +	reduzierte Glucosylfructose	31	0,33
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 1) mtl	Glucosylmannit	19	0,20
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) gut	Maltit	31	5,1
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) gut	Malbit®	122	12,7
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6) gut	Glucosylsorbit	31	0,96
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 1) mtl +	Palatinit®	37	0,76
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6) gut			

<sup>1)</sup> Boehringer, Mannheim (mit Glycerin stabilisiert)

Tab. 3.  $\alpha$ -Glucosidase aus Hefe<sup>1)</sup>.

	Substrat	$k_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu$ mol/min $\times 1$ mg Protein) %
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 1) fru	Glucosyl- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 1)-fructose <sup>2)</sup>	14	1,3
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ $\beta$ 2) fru	Saccharose <sup>3)</sup>	37	23
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3) fru	Turanose <sup>4)</sup>	23	21
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) glc	Maltose <sup>3)</sup>	30	22
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 5) fru	Leucrose <sup>5)</sup>	17	0,22
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6) glc	Isomaltose <sup>4)</sup>	35	0,6
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6) fru	Isomaltulose <sup>7)</sup>	14	0,8
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 1) mtl	Glucosylmannit <sup>2)</sup> (A)	22	0,23
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 1) gut }	reduzierte		
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 1) mtl }	Glucosyl- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 1)-fructose <sup>2)</sup>	25	0,5
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) gut	Maltit <sup>6)</sup>	80	8,7
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) gut	Malbit	102	10,5
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6) gut	Isomaltit <sup>2)</sup> (B)	9	0,56
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 1) mtl }	Palatinit <sup>®2)</sup> ***	11	0,40
glc $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6) gut }			

Bezugsquellen:

<sup>1)</sup> Boehringer, Mannheim<sup>2)</sup> Dr. Schiweck, Grünstadt<sup>3)</sup> Merck<sup>4)</sup> Sigma

\*\*\*) 1:1-Gemisch aus (A) und (B)

<sup>5)</sup> Dr. Schwengers, Dormagen<sup>6)</sup> Serva<sup>7)</sup> Dr. Straeter, Mannheim

charidalkohol in keinem Fall zu einer Erhöhung der Michaelis-Konstanten geführt; dagegen sind die Hydrolyseraten ( $v_{max}$ ) infolge Reduktion um etwa den Faktor 2–8 niedriger, wie die Beispielpaare D-Glucosyl- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 1)-D-fructose gegen reduzierte Verbindung, Maltose gegen Maltit, sowie Isomaltulose gegen Palatinit<sup>®</sup> zeigen.

$\alpha$ -Glucosidase aus Hefe ist unter passenden Bedingungen zur Katalyse von Transferreaktionen imstande (18, 19). So konnte u. a. dünn-schicht-chromatographisch bei Inkubation von Maltose mit Xylit die Bildung von drei Glucosylxyliten, mit Erythrit von zwei Glucosylerythriten, mit Glycerin von Glucosylglycerin gezeigt werden. Die Nachweisbarkeitsgrenze auf der dünnen Schicht liegt nahe, daß jeweils wenige Prozente der eingesetzten Maltose unter Glucosyltransfer auf Polyole umgesetzt worden sind.

## Diskussion

Die Bedeutung der  $\alpha$ -Glucosidase aus Hefe liegt neben ihrem Einsatz für analytische Zwecke (20) vor allem darin, daß sie gegenüber den später (10) zu behandelnden Carbohydrasen aus Jejunal-mucosa ein hochgereinigtes Enzym darstellt, welches die generelle Substrateignung einer neuen Verbindung abzuschätzen gestattet, insbesondere bei Gegenüberstellung der mit Invertase (9) und Jejunal-mucosa (10) erhaltenen Resultate.

Die Daten der Tabelle 3 mit kinetischen Werten für 13 Substrate legen die Frage nach der Spezifität der  $\alpha$ -Glucosidase nahe. Eine Reduktion der

Carbonylgruppe ändert offenbar nichts Prinzipielles an der Substrat-eignung einer Substanz, da  $k_m$  nur wenig,  $v_{max}$  um weniger als das 10fache verändert werden. Wenn eine  $\alpha$ -Glucosidase-katalysierte Transferreaktion auf einen Akzeptor wie z. B. ein Polyol nachgewiesen ist, schließt dies die Möglichkeit einer enzymatisch katalysierten Hydrolyse des betreffenden Transferproduktes ein. Daher sind in Spezifitätsüberlegungen die in Tabelle 3 genannten Substanzen und die bei Transferreaktionen beobachteten Produkte einzubeziehen. Solche neuen Disaccharid-artigen Substanzen sind früher (18, 19) mit anderer Zielsetzung bereits beschrieben worden.

Solange jedoch keine dreidimensionalen Strukturen für alle geprüften Substrate und die entsprechenden Orte des Enzyms bekannt sind, soll von einer eingehenden Spezifitäts-Diskussion an dieser Stelle abgesehen werden. Für die in dieser Mitteilung verfolgten praktischen Zwecke ist die eingehende Kenntnis der Spezifität der Hefe- $\alpha$ -Glucosidase keine unabdingbare Voraussetzung. So werden sich auch andere Substanzen als Palatinit® der enzymatischen Analyse mittels  $\alpha$ -Glucosidase (20) zuführen lassen. Jedenfalls würde die Vereinbarkeit der hier mit  $\alpha$ -Glucosidase gemessenen Werte mit den Ergebnissen der  $\beta$ -Fructosidase aus Hefe (9) und der Jejunal mucosa (10) die Feststellung sichern, ob ein Disaccharid oder ein Disaccharidalkohol ein potentieller Zuckeraustauschstoff ist. Als mögliche Kandidaten zeichnen sich für weitere Vorprüfungen (9, 10) ab: Leucrose, Isomaltose und Isomaltulose sowie Palatinit® und seine Komponenten, einschließlich D-Glucosyl- $\alpha(1\rightarrow1)$ -D-glucit.

#### Danksagung

Frl. A. Heidloff und Frau E. Spirk ist für die technische Mitarbeit zu danken. Die Versuche wurden dankenswerterweise durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Si 48/23-1) unterstützt.

#### Literatur

1. Großklaus R (Hrsg), Einsatz von Zuckersubstituten im Kampf gegen Karies. BGA-Symposium 11. 11. 1985 in Berlin, im Druck
2. Grupp U, Siebert G (1978) Metabolism of hydrogenated palatinose, an equimolar mixture of  $\alpha$ -D-glucopyranosido-1,6-sorbitol and  $\alpha$ -D-glucopyranosido-1,6-mannitol. Res Exp Med (Berl) 173:261-278
3. Imai S, Takeuchi K, Shibata K, Yoshikawa S, Kitahata S, Okada S, Arya S, Nisizawa T (1984). Screening of sugars inhibitory against sucrose-dependent synthesis and adherence of insoluble glucan and acid production by streptococcus mutans. J dent Res 63:1293-1297
4. Oku T, Tokunaga T, Hosoya N (1984) Nondigestibility of a new sweetener, "neo-sugar", in the rat. J Nutr 114:1574-1581
5. Kearsley MW, Birch GG, Lian-Loli PHP (1982) The metabolic fate of hydrogenated glucose syrups. Starch/Stärke 34:279-283
6. Siebert G, Ziesentz SC (1985) Kariogenitätsprüfungen - Gegenwärtiger Stand und kommende Entwicklungen. Dtsch zahnärztl Z 40:823-827
7. Wenk C, Kronauer M, Schutz Y, Bickel H (Hrsg) (1985) Die Verwertung der Nahrungsenergie durch Tier und Mensch. Wissenschaftl Verlagsgesellschaft, Stuttgart

8. Siebert G, Ziesenitz SC (1986) Acidogenesis in vitro by streptococcus mutans NCTC 10449 – Rapid assay for sugar specificity and inhibitor screening. J dent Res, submitted
9. Ziesenitz SC (1986) Stufenweises Prüfschema für Zuckeraustauschstoffe – Vorprüfung mittels Enzymen. 2.  $\beta$ -Fructosidase. Z Ernährungswiss 25:248–252
10. Ziesenitz SC Stufenweises Prüfschema für Zuckeraustauschstoffe – Vorprüfung mittels Enzymen. 3. Carbohydrasen aus Jejunal mucosa des Menschen. Z Ernährungswiss 25:253–258
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J biol Chem 193:265–275
12. Dahlqvist A (1964) Method for assay of intestinal disaccharidases. Analyt Biochem 7:18–25
13. Bergmeyer HU, Bernt E, Schmidt F, Stork H (1970) D-Glucose-Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. In: Bergmeyer HU (Hrsg), Methoden der Enzymatischen Analyse. 2. Aufl Bd II S 1163–1168. Verlag Chemie, Weinheim
14. Bernt E, Bergmeyer HU (1970) D-Fructose. In: Bergmeyer HU (Hrsg), Methoden der Enzymatischen Analyse. 2. Aufl Bd II S 1266–1269. Verlag Chemie, Weinheim
15. Segel IH (1976) Biochemical calculations, 2nd Edition. John Wiley & Sons, New York Chichester Brisbane Toronto
16. Rudolph FB, Fromm HJ (1983) Plotting methods for analyzing enzyme rate data. In: Purich DL (ed), Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism. Academic Press, New York London, pp 53–73
17. Cornish-Bowden (1974) A simple graphical method for determining inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. Biochem J 137:143–144
18. Avigad G (1959) Synthesis of glucosylfructoses by the action of a yeast  $\alpha$ -glucosidase. Biochem J 73:587–593
19. Manners DJ, Pennie IR, Stark JR (1968) Studies on carbohydrate-metabolizing enzymes. Part XVII: The enzymic synthesis of some disaccharides containing  $\alpha$ -D-glycosyl residues. Carbohydr Res 7:291–298
20. Gau W, Kurz J, Müller L, Fischer E, Steinle G, Grupp U, Siebert G (1979) Analytische Charakterisierung von Palatinin. Z Lebensm Unters Forsch 168:125–130

Eingegangen 19. September 1986

Für die Verfasser:

Prof. Dr. G. Siebert, Abteilung für experimentelle Zahnheilkunde, Pleicherwall 2, D-8700 Würzburg