

Stufenweises Prüfschema für Zuckeraustauschstoffe – Vorprüfung mittels Enzymen. 2. β -Fructosidase aus Hefe

S. C. Ziesenitz

Abteilung für Experimentelle Zahnheilkunde, Universität Würzburg

Zusammenfassung: Außer Saccharose sind keine D-Glucosylfructosen, weder das $\alpha(1 \rightarrow 1)$ - noch das $\alpha(1 \rightarrow 3)$ - oder das $\alpha(1 \rightarrow 5)$ - oder das $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -Disaccharid, Substrate der β -Fructosidase der Hefe. Die beiden letztgenannten Zucker, Leucrose und Isomaltulose, reagieren jedoch als nichtkompetitiver (Leucrose) bzw. unkompetitiver (Isomaltulose, Palatinose®) Inhibitor mit β -Fructosidase. Dieses Enzym hat sich infolge seiner hohen Spezifität als vorhersageträchtig für kariologische Aspekte von Zuckeraustauschstoffen mit Glykosidbindung(en) erwiesen.

Summary: No D-glucosylfructoses except sucrose, neither the $\alpha(1 \rightarrow 1)$ - nor the $\alpha(1 \rightarrow 3)$ - or the $\alpha(1 \rightarrow 5)$ - or the $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -disaccharide possess substrate properties for β -fructosidase from yeast. The two latter ones, leucrose and isomaltulose, however, are non-competitive (leucrose) or uncompetitive (isomaltulose, Palatinose®) inhibitors of β -fructosidase from yeast. Due to the high substrate specificity of invertase, assays of its activity have predictive power for cariological aspects of sugar substitutes carrying glycoside bonds between glucose and fructose.

Schlüsselwörter: Glucosidase, Maltase, Zuckeraustauschstoff, Palatin®[®], Trehalose

Einleitung

In einer vorangehenden Mitteilung (1) ist der Einsatz von Carbohydrasen zur raschen Prüfung von Disacchariden und ihren Reduktionsprodukten auf ihre Eignung als mögliche Zuckeraustauschstoffe begründet worden. Dabei war α -Glucosidase aus Hefe zu einer ersten Charakterisierung verwendet worden (1). Als ein weiteres Enzym mit beachtlicher Aussagekraft für die Vorprüfung wird von uns wegen seiner hohen Substratspezifität β -Fructosidase (Invertase) aus Hefe angesehen. β -Fructosidase reagiert mit Saccharose und verwandten Glykosiden unter Hydrolyse oder Fructosyl-Übertragung; im Substrat muß ein terminaler, nicht substituierter β -D-Fructofuranosyl-Rest stehen (2,3). Die mit Invertase erhaltenen Ergebnisse werden in dieser Mitteilung dargestellt.

Material und Methoden

Die Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Disaccharide und Polyole ist in der vorangehenden Arbeit verzeichnet (1). β -Fructosidase wurde von Boehringer, Mannheim, bezogen.

Inkubations-, Analyse- und Auswertungsverfahren für enzymatische Spaltansätze sind in der vorangehenden Arbeit (1) ausführlich beschrieben.

Ergebnisse

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß in der Tat keine der neben Saccharose geprüften Substanzen durch Invertase hydrolysiert werden kann. Eine Substanz wird als nicht spaltbar – ohne Substrateigenschaften – angesehen, wenn keine Freisetzung der Monosaccharide Glucose und Fructose unter Bedingungen erfolgt, unter denen Saccharose das mehr als 10^4 – 10^5 -fache dieser Monosaccharide liefert.

In einer Reihe von Fällen ist geprüft worden, ob ein Disaccharid, wenn es nicht Substrat der β -Fructosidase ist, gleichwohl die Enzymaktivität zu beeinflussen vermag. Das ist laut Tabelle 2 der Fall: Leucrose und Isomaltulose (Palatinose®) erweisen sich als Inhibitoren der Invertase und können diese Wirkung nur entfalten, wenn β -Fructosidase die Fähigkeit zur Bindung der Disaccharide besitzt. Entsprechende Befunde mit Palatinit® sind schon früher erhoben worden (4). Damit ordnen sich D-Glucosylfructosen so, daß das $\alpha(1 \rightarrow 1)$ -Disaccharid („Trehalulose“) gegenüber Invertase inert ist, das $\alpha(1 \rightarrow 5)$ -Disaccharid (Leucrose) Inhibitorwirkung von nicht kompetitivem Charakter aufweist, während das $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -Disaccharid (Palatinose®) einen unkompetitiv wirkenden Hemmstoff darstellt. Auch das Reduktionsprodukt von Palatinose®, nämlich Palatinit®, ist (4) ein nichtkompetitiver Inhibitor.

Diskussion

Wie an anderer Stelle beschrieben (5), besitzen zur Vergärung von Zuckern befähigte *S. mutans*-Zellen u. a. eine Invertase-artige Enzymaktivität. Zum Teil ist diese intrazellulär anzutreffen, u. a. bei *S. mutans* (6–11), *S. mitis* (12) und *B. subtilis* (13); sie wird als mit dem Zuckertransport in die Bakterienzelle hinein funktionell verknüpft angesehen (8) oder gar direkt für identisch mit Sucrose-6-phosphat-Hydrolase gehalten (6). Extrazellulär vorkommende Invertase wird u. a. für *S. mutans* und *S. salivarius* (14) sowie für *A. viscosus* (15) beschrieben, wobei zu bedenken ist, daß extrazellulär wirkende Glycosidasen bei *S. mitis*, *S. sanguis* und *S. mutans* häufig anzutreffen sind (16). Invertase-Befunde in Plaque-Flüssigkeit (17–20) vervollständigen das Bild.

Tab. 1. β -Fructosidase aus Hefe.

Substrat	k_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg Enzym}$)
Saccharose	10–12	140
Keine Substrat-Eigenschaften:		
glc $\alpha(1 \rightarrow 1)$ fru		Trehalulose
glc $\alpha(1 \rightarrow 3)$ fru		Turanose
glc $\alpha(1 \rightarrow 4)$ fru		Maltose
glc $\alpha(1 \rightarrow 5)$ fru		Leucrose
glc $\alpha(1 \rightarrow 6)$ fru		Isomaltulose
glc $\alpha(1 \rightarrow 1)$ mtl + glc $\alpha(1 \rightarrow 6)$ gut }		Palatinit®

Tab. 2. Inhibitoren der β -Fructosidase.

	Substrat	k_i (mM)	Hemmtyp
glc $\alpha(1 \rightarrow 5)$ fru	Leucrose	10–12	nichtkompetitiv
glc $\alpha(1 \rightarrow 6)$ fru	Isomaltulose	18	unkompetitiv
glc $\alpha(1 \rightarrow 1)$ mtl + glc $\alpha(1 \rightarrow 6)$ gut	Palatinit®)	60	nichtkompetitiv

Keine Hemmung mit D-Glucosyl- $\alpha(1 \rightarrow 1)$ -D-fructose

*) aus U. Grupp und G. Siebert, Res. Exp. Med. (Berl.) **173**, 261–278 (1978)

In dieser Arbeit dient Invertase aus Hefe als Modell; wird sie gehemmt, wie es laut Tabelle 2 durch Leucrose und Isomaltulose in unterschiedlicher Weise geschieht, so erhebt sich die Frage, ob diese Disaccharide auch die Saccharose-Vergärung durch *S. mutans* zu hemmen vermögen. Dies ist inzwischen experimentell erwiesen worden (G. Siebert und P. Thim, unveröffentlicht). Insofern hat die eingehende Untersuchung der β -Fructosidase mit neuartigen Disacchariden eine wichtige Bedeutung für die Vorhersage ihrer evtl. kariogenen oder nichtkariogenen Eigenschaften.

Zucker, welche durch Invertase gut hydrolysiert werden, wie z. B. Nystose (5), sind auch mit *S. mutans* kräftige Säurebildner. Dagegen sind mit Invertase nicht spaltbare Zucker schlechte oder gar keine Säurebildner (21). Die kariologisch relevante Aussage besteht also hier in einem negativen Befund, der Unspaltbarkeit durch Invertase. Diese Überlegung macht klar, daß Invertase hier nicht Gegenstand der Untersuchung, sondern Werkzeug ist, um Substrate zu charakterisieren und potentielle Zuckeraustauschstoffe zu erkennen.

Wegen der Wichtigkeit negativer Befunde sind auch solche Disaccharide in die Studie einbezogen worden, für die zwar aufgrund der Spezifitätsangaben für Invertase (2,3) fehlende Substrateignung angenommen werden mußte, Meßdaten aber noch nicht vorlagen. Die Spezifitätsangaben für Invertase (2,3) werden durch die Befunde der Tab. 1 insofern bestätigt, als „Trehalulose“ [$\alpha(1 \rightarrow 1)$], Turanose [$\alpha(1 \rightarrow 3)$], Leucrose [$\alpha(1 \rightarrow 5)$] und Palatinose® [$\alpha(1 \rightarrow 6)$] keine Substrate des Enzyms sind. Diese Spezifitätsregeln gelten nicht mehr, wenn es um die Hemmung der Invertase geht; „Trehalulose“ hemmt nicht, Leucrose und Isomaltulose hemmen mit unterschiedlichem Hemmtyp (Tab. 2), und auch reduzierte Isomaltulose (Palatinit®) ist Inhibitor, aber von anderem Hemmtyp als Palatinose®.

Zunächst unerklärt bleiben muß es, warum Leucrose und Isomaltulose unterschiedlichen Hemmtyp zeigen. Zwar ist Leucrose (22) chemisch gut charakterisiert, aber ein Vergleich mit Isomaltulose kann nicht weit genug geführt werden, um aus der Disaccharid-Struktur ohne eingehende Kenntnis des aktiven Ortes der β -Fructosidase und seiner Umgebung zu tieferem Verständnis der Hemmeffekte zu gelangen. So muß es einstweilen offenbleiben, warum Isomaltulose als unkompetitiver Inhibitor nur mit dem Enzym-Substrat-Komplex zu reagieren vermag, während Leucrose wie auch Palatinit® an das Enzym und/oder an den Enzym-Substrat-Komplex gebunden werden könnten.

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. Siebert G, Ziesenitz SC (1986) Stufenweises Prüfschema für Zuckeraustauschstoffe – Vorprüfung mittels Enzymen. 1. α -Glucosidase aus Hefe. Z Ernährungswiss 25:242–247
2. Myrbäck K (1960) Invertases. In: Boyer PD, Lardy HA, Myrbäck K (eds) The Enzymes. 2nd ed, 4:379–369. Academic Press, New York London
3. Lampen JO (1971) Yeast and Neurospora Invertases. In: The Enzymes (Boyer PD ed) 3rd ed, 5:291–305. Academic Press, New York London
4. Grupp U, Siebert G (1978) Metabolism of hydrogenated palatinose, an equimolar mixture of α -D-Glucopyranosido-1,6-sorbitol and α -D-Glucopyranosido-1,6-mannitol. Res exp Med (Berl) 173:261–278
5. Siebert G, Ziesenitz SC (1987) On the assessment of Nystose as a sugar substitute. J Nutr, submitted
6. Chassy BM, Porter EV (1979) Initial characterization of Sucrose-6-phosphate hydrolase from *Streptococcus mutans* and its apparent identity with intracellular invertase. Biochem Biophys Res Comm 89:307–314
7. St Martin EJ, Wittenberger ChL (1979) Regulation and function of Sucrose-6-phosphate hydrolase in *Streptococcus mutans*. Infection and Immunity 26:487–491
8. Gibbons RJ (1972) Presence of an invertase-like enzyme and a sucrose permeation system in strains of *Streptococcus mutans*. Caries Res 6:122–131
9. Tanzer JM, Brown AT, McInerney MF (1973) Identification, preliminary characterization, and evidence for regulation of invertase in *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 116:192–202
10. Tanzer JM, Brown AT, McInerney MF, Woodiel FN (1977) Comparative study of invertases of *Streptococcus mutans*. Infect Immun 16:318–327
11. Kuramitsu HK (1973) Characterization of invertase activity from cariogenic *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 115:1003–1010
12. Sund ML, Linder L (1979) Purification and characterization of β -Fructofuranosidase (Invertase) from an oral strain of *Streptococcus mitis*. Archs oral Biol 24:439–447
13. Kunst F, Pascal M, Lepesant JA, Walle J, Dedonder R (1974) Purification and some properties of an endocellular sucrase from a constitutive mutant of *Bacillus subtilis* Marburg 168. Eur J Biochem 42:611–620
14. Chassy BM, Bielawski RM, Beall JR, Porter EV, Krichevsky MJ, Donnersloot JA (1974) Extracellular invertase in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius*. Life Sci 15:1173–1180
15. Polenik CJ, Miller CH (1975) Extracellular invertase activity from *Actinomyces viscosus*. J dent Res 54:186
16. Nord CE, Linder L, Wadström T, Lindberg AA (1973) Formation of glycoside-hydrolases by oral streptococci. Archs oral Biol 18:391–402
17. Birkhed D, Dahlqvist A (1975) Biochemical studies on the “sucrase” activity in supernatants of human dental plaque material. Odont Revy 26:109–124
18. Fiehn NE, Moe D (1982) Effect of the α -Glucosidase inhibitor, acarbose, on disaccharide splitting enzymes in human dental plaque. Scand J Dent Res 90:124–130
19. Tatevossian A (1982) Hydrolysis of some carbohydrate substrates by enzymes of pooled human dental plaque fluid. Archs oral Biol 27:39–43

20. Fiehn NE, Moe D (1983) Effect of seven inhibitors on invertases in homogenates of human dental plaque. Scand J Dent Res 91:175-181
21. 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
22. Stodola FH, Sharpe ES, Koepsell JJ (1956) The preparation, properties and structure of the disaccharide leucrose. J Amer chem Soc 78:2514-2518

Eingegangen 19. September 1986

Anschrift des Verfassers:

Frau Dr. S. C. Ziesenitz, Abteilung für Experimentelle Zahnheilkunde, Pleicherwall 2, D-8700 Würzburg