

Enzymatische Hydrolyse der α,α -Trehalose und ihrer Desoxyderivate

^aI. JEŽO und ^bJ. ZEMEK

^a*Chemisches Institut, Zentrum für Chemische Forschung der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, CS-842 38 Bratislava*

^b*Institut für Biotechnologie der Slowakischen Technischen Hochschule, CS-812 37 Bratislava*

Eingegangen am 26. Februar 1986

Es wird der Verlauf der enzymatischen Hydrolyse von 2-Desoxy-, 3-Desoxy-, 4-Desoxy-, 6-Desoxy-, 2,2'-Dideoxy-, 3,3'-Dideoxy-, 4,4'-Dideoxy- und 6,6'-Dideoxy- α,α -trehalose, katalysierten mit Modellenzymen des Trehalasetyps, beschrieben.

The course of enzymatic hydrolysis of 2-deoxy-, 3-deoxy-, 4-deoxy-, 6-deoxy-, 2,2'-dideoxy-, 3,3'-dideoxy-, 4,4'-dideoxy-, and 6,6'-dideoxy- α,α -trehalose, catalyzed by model enzymes of the trehalase type, is described.

Описывается протекание ферментативного гидролиза 2-дезоксид-, 3-дезоксид-, 4-дезоксид-, 6-дезоксид-, 2,2'-дидезокси-, 3,3'-дидезокси-, 4,4'-дидезокси- и 6,6'-дидезокси- α,α -трегалозы, катализируемого модельными ферментами трегалазного типа.

In vorhergehenden Arbeiten haben wir uns mit dem Einfluß der Hydroxylgruppen des Glucosyldonors und der mono-, oligo- und polysaccharidischen Akzeptoren auf die Transglycosylationsreaktionen bei der Biosynthese des Glycogens [1, 2], der α,α -Trehalose [3—5], der Lactose [6], der Saccharose [7] und der Biosynthese der α -Glucane aus Stärke, katalysierten mit der Pflanzenphosphorylase, beschäftigt [8]. Dabei haben wir festgestellt, daß die Hydroxylgruppen des glucosylierten Donors von dem Standpunkt des Verlaufes der einzelnen Reaktionen nicht gleichwertig sind und weiter, daß sich die Substrateigenschaften der Reaktionsdonoren von nativem Substrat über 2-Desoxy-, 6-Desoxy-, 4-Desoxy- zum 3-Desoxyderivat verschlechtern. Bei Hydrolasereaktionen verfolgten wir die Kinetik der Hydrolyse der 6,6'-Dideoxylactose [9] sowie auch der Cellobiose, 6-Desoxy-, 6'-Desoxy- und 6,6'-Dideoxycellobiose mittels β -Glucosidase [10] und stellten fest, daß die Cellobiose, aber auch ihre Mono- und Dideoxyderivate für β -Glucosidase Substrateigenschaften haben. Der Austausch der Hydroxylgruppe in C-6 gegen ein Wasser-

stoffatom äußerte sich dabei mit markanterer Verschlechterung der Substrateigenschaften als der Austausch der Hydroxylgruppe in C-6' gegen ein Wasserstoffatom und weiter, daß der gleichzeitige Austausch beider Hydroxylgruppen in C-6 und C-6' gegen Wasserstoffatome sich vom Standpunkt der Kinetik des Hydrolasereaktionsverlaufes mit der deutlichsten Verlangsamung des Verlaufes der studierten Reaktion äußerte. Wenn auch wir bisher analogische Studien mit Maltose und ihrer Desoxyderivate, katalysierten mit α -Glucosidase, nicht realisierten, auf Grund bisheriger Erfahrungen aber auch aus vorläufigen Versuchen vermuten wir, daß nach genügend langer Reaktionszeit sich Mono- und auch Didesoxyderivate der Maltose als Substrat für α -Glucosidasen erweisen werden [1, 2].

In vorgelegter Arbeit, in welcher wir die Substrateigenschaften der Mono- und Didesoxyderivate der α,α -Trehalose, katalysierten mit Modelltrehalasen, beschrieben, haben wir Trehalasen, isolierten aus *Saccharomyces cerevisiae*, ferner aus *Aureobasidium pullulans* und schließlich aus dem Thorax der Bienen (*Apis mellifera*) verwendet.

Wir haben festgestellt, daß sich von der getesteten Gruppe der Mono- und Didesoxyderivate der α,α -Trehalose die Substrateigenschaften in Reaktionen, katalysierten mit Modellenzymen des Trehalasetyps, ausschließlich bei den Monodesoxyderivaten äußerten, während keiner der Didesoxyderivate für die Trehalase ein Substrat war und nicht einmal dann, wenn der Kontakt des Enzyms mit Didesoxy- α,α -trehalosen genügend lang war (> 24 h), obwohl man ins Reaktionsgemisch genügend große Enzymaktivität applizierte und zur Bestimmung der Reaktionsprodukte man empfindliche radiometrische Methoden verwendete. Ferner haben wir festgestellt, daß bei Verwendung der obenerwähnten Typen der Modelltrehalasen ähnlich, wie es schon in früheren Arbeiten festgestellt worden ist, so auch in verfolgter Reaktion sich immer die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse von nativer α,α -Trehalose über 2-Desoxy-, 6-Desoxy-, 4-Desoxy- zur 3-Desoxy- α,α -trehalose verminderte. Auch in diesem Fall wurde der Trend bei der Modellhydrolasereaktion, den wir in unseren vorhergehenden Arbeiten für die Reaktion der Enzyme des Transglycosylasetyps [1—8] beschrieben haben, bewahrt, wobei sich die Hydroxylgruppe in C-2 des Glycosyldonors als die am wenigsten essentielle für die Erhaltung der Substrateigenschaften erwies. Danach folgten die Hydroxylgruppen in C-6 und C-4 und am auffälligsten beeinflusste die Substrateigenschaften die Hydroxylgruppe in C-3.

Diese Feststellung teilweise, und auch das nur für die Hydroxylgruppe in C-2, bestätigt den hypothetischen Mechanismus der Trehalasereaktion [11], der voraussetzt, daß im Hydrolysenverlauf sich vorübergehend das zugehörige 1,2-Epoxyderivat bilden muß.

Auf Grund des Angeführten vermuten wir, daß in symmetrischem Molekül der α,α -Trehalose die Hydrolyse mittels Trehalase gleichmäßig mit beiden Moleküleenden beeinflußt ist, während bei Monodesoxyderivaten die Bildung eines produktiven Enzym-Substrat-Komplexes nur dann stattfindet, wenn die Trehalase mit dem unveränderten D-Glucopyranosylteil des α,α -Trehalosemolekül interagiert. Dann ist die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes bei Didesoxyderivaten der α,α -Trehalose sichtlich ausgeschlossen.

Bisher testete man die 6-Desoxy- und 6,6'-Didesoxy- α,α -trehalosen als Substrate für Trehalasen, die man aus Maikäfern, ferner aus *Pseudomonas fluorescens* und schließlich aus Nieren und Därmen der Schweine isolierte [12, 13]. Auch in diesen Fällen konnte man die Substrateigenschaften nur bei α,α -Trehalose und ihrer 6-Desoxyderivate beweisen. Dabei bei Verwendung der, aus Maikäfern isolierten Trehalase stellte man für α,α -Trehalose den Zahlenwert $K_m = 0,6 \text{ mmol dm}^{-3}$, während für die 6-Desoxy- α,α -trehalose den Zahlenwert $K_m = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ fest. Bei Verwendung der, aus *Pseudomonas fluorescens* isolierten Trehalase stellte man für das native Substrat den Zahlenwert $K_m = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ und für 6-Desoxy- α,α -trehalose $K_m = 40 \text{ mmol dm}^{-3}$ fest.

Erzielte Zahlenwerte der enzymatischen Hydrolyse der geprüften Substanzen haben wir in den Tabellen 1 und 2 zusammengefaßt.

Tabelle 1

Charakteristik der α,α -Trehalose und ihrer Desoxyderivate

Verbindung	$K_m/(\text{mmol dm}^{-3})$			$v_{r,0}$		
	a	b	c	a	b	c
α,α -Trehalose	2,6	3,2	1,4	1,0	1,0	1,0
2-Desoxy- α,α -trehalose	5,1	7,4	3,1	0,26	0,20	0,18
3-Desoxy- α,α -trehalose	24,3	28,2	4,8	0,06	0,03	0,02
4-Desoxy- α,α -trehalose	18,0	20,5	3,9	0,10	0,08	0,06
6-Desoxy- α,α -trehalose	5,7	7,9	3,4	0,21	0,17	0,15

a) Trehalase aus *Saccharomyces cerevisiae*.b) Trehalase aus *Aureobasidium pullulans*.

c) Trehalase aus dem Thorax der Bienen.

$v_{r,0}$ — relative Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse der Desoxy- α,α -trehalosederivate, bezogene auf die Hydrolysegeschwindigkeit der α,α -Trehalose = 1.

Obleich in der Fachliteratur die Synthese der 6-Desoxysowie auch der 6,6'-Didesoxy- α,α -trehalose schon bekannt ist [12, 15], beschrieben wir die Herstellung dieser Verbindungen nur deshalb, weil die von uns festgestellten

physikalisch-chemischen Konstanten der beiden Verbindungen sich teilweise von den, in der Literatur angegebenen Angaben, unterscheiden.

Die gewünschten Produkte haben wir folgend hergestellt:

i) durch Hydrierung der Hepta-*O*-acetyl-6-desoxy-6-jod- α,α -trehalose gewonnene Hepta-*O*-acetyl-6-desoxy- α,α -trehalose (*I*) ergibt nach Zemplen-scher Deacetylierung die gewünschte 6-Desoxy- α,α -trehalose (*II*);

ii) analogisch (wie ad i)) kann man aus Hexa-*O*-acetyl-6,6'-didesoxy-6,6'-dijod- α,α -trehalose Hexa-*O*-acetyl-6,6'-didesoxy- α,α -trehalose (*III*) und aus dieser nach Deacetylierung 6,6'-Didesoxy- α,α -trehalose (*IV*) gewinnen.

Tabelle 2
Charakteristik der α,α -Trehalose und ihrer Desoxyderivate

Verbindung	$v_{\max}/(\text{mmol dm}^{-3} \text{ s}^{-1})$			$\pm s$			<i>N</i>
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	
α,α -Trehalose	0,76	0,52	0,82	0,010	0,020	0,020	5
2-Desoxy- α,α -trehalose	0,32	0,19	0,35	0,005	0,010	0,010	5
3-Desoxy- α,α -trehalose	0,05	0,03	0,06	0,001	0,001	0,001	5
4-Desoxy- α,α -trehalose	0,09	0,06	0,11	0,005	0,001	0,005	5
6-Desoxy- α,α -trehalose	0,28	0,18	0,30	0,005	0,005	0,005	5

a, b, c — siehe Tabelle 1.

$v_{\max}$ — maximale Hydrolysegeschwindigkeit der Desoxy- α,α -trehalosederivate.

$\pm s$ — statistische mittlere Deviation (in $\text{mmol dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$).

N — Anzahl der Messungen.

Experimenteller Teil

Optische Messungen wurden mit dem Perkin 141 Polarimeter (100 mm Röhrchen), $[\alpha]$ (λ_D , $\theta = 20^\circ\text{C}$, $\rho = 10 \text{ g dm}^{-3}$, in ...) durchgeführt. Die IR-Spektren wurden auf dem Perkin—Elmer 983 G-Spektrometer registriert.

Dünnschichtchromatographie (TLC)

Silufol-Kavalier, ČSSR; Elution: AcOEt—Petroläther (Volumenverhältnis = 9 : 1); Detektion: EtOH + H_2SO_4 (5 %).

Absteigende Papierchromatographie

a) Whatman I; Elution: n-BuOH—EtOH— H_2O (Volumenverhältnis = 5 : 1 : 4); Detektion: HIO_4 + Benzidin.

b) Whatman I; Elution: AcOEt—2-PrOH— H_2O (Volumenverhältnis = 6 : 2 : 1); Detektion: HIO_4 + Benzidin.

c) Whatman I; Elution: AcOEt—Py—H₂O (Volumenverhältnis = 8:2:1); Detektion: Szintillation-Packard-3330-Spectroscope (nach Einweichen in Szintillationsflüssigkeit SLX).

Sämtliche Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

Herstellung der Desoxy- und Didesoxy- α,α -trehalosen

2-Desoxy- α,α -trehalose wurde nach dem in [3] beschriebenen Verfahren hergestellt.

2-Desoxy-, 3-Desoxy-, 4-Desoxy- und 6-Desoxy- α,α -trehalose, markierten in entsprechender Stelle mit Radionukleon, wurden nach dem in [5] angeführten Verfahren hergestellt.

Analogisch wurden die notwendigen Verbindungen, markierten (U-¹⁴C) in dem D-Glucopyranosylteil der α,α -Trehalose, hergestellt.

2,2'-Didesoxy-, 3,3'-Didesoxy- und 4,4'-Didesoxy- α,α -trehalose, markierten in zugehörigen Desoxy-Stellen mit Radionukleon ³H, wurden biosynthetisch nach dem in [5] angeführten Verfahren hergestellt.

Hepta-O-acetyl-6-desoxy- α,α -trehalose (I)

Eine Lösung von 0,25 g Hepta-O-acetyl-6-desoxy-6-jod- α,α -trehalose [14] in 20 cm³ Essigsäureäthylester, 0,3 cm³ Triäthylamin wird nach Zugabe von 0,2 g Pd/C ($w(\text{Pd}) = 10\%$) bis zum Aufhören der Wasserstoffabsorption hydriert. Nach üblicher Verarbeitung des Reaktionsgemisches und nach Umkristallisierung des gewonnenen Produktes aus Äthanol gewinnt man eine Verbindung (0,17 g; Ausbeute = 83 %) mit Schmp. = 95—96 °C; $[\alpha]$ (in CHCl₃) = + 189°. Das Produkt war chromatographisch einheitlich (TLC).

Für C₂₆H₃₆O₁₇ ($M_r = 620,53$) $w_i(\text{berechnet})$: 50,32 % C, 5,85 % H; $w_i(\text{gefunden})$: 50,27 % C, 5,90 % H. Literatur [12] gibt Schmp. = 89—90 °C; $[\alpha]$ (in CHCl₃) = + 184° an.

6-Desoxy- α,α -trehalose (II)

In eine Lösung von 0,15 g I in 5 cm³ abs. Äthanol gibt man 0,5 cm³ 0,2 M-CH₃ONa hinzu und läßt das Reaktionsgemisch 24 h bei Raumtemperatur stehen. Nach Deionisierung (Zerolit-225 (H⁺)) (10 min) dampft man das Filtrat ab und den Destillationsrückstand kristallisiert man aus einem Gemisch von abs. Äthanol und Äther um (Ausbeute: ca. 100 %). Schmp. = 113—115 °C; $[\alpha]$ (in H₂O) = + 155,8°. Im Hydrolysat von II kann man chromatographisch (a) die Anwesenheit der D-Chinovose ($R_F = 0,32$) und der D-Glucose ($R_F = 0,08$) feststellen. Literatur [12] gibt Schmp. = 115—117 °C; $[\alpha]$ (24 °C; in H₂O) = + 155° an.

Hexa-O-acetyl-6,6'-didesoxy- α,α -trehalose (III)

Aus 2,6 g Hexa-O-acetyl-6,6'-didesoxy-6,6'-dijod- α,α -trehalose [14] im Essigsäureäthylester (100 cm³) und Triäthylamin (1 cm³) bei Anwesenheit von 0,5 g Pd/C ($w(\text{Pd}) = 10\%$) gewinnt man nach obenerwähntem Verfahren (ad I) ein Produkt (1,55 g; Ausbeute = 86 %) mit Schmp. = 189—190 °C; $[\alpha]$ (in CHCl₃) = + 109,5°. Das Produkt war chromatographisch einheitlich (TLC). Literatur [15] gibt Schmp. = 191—193 °C; $[\alpha]$ (27,5 °C; in CHCl₃) = + 106° an.

6,6'-Didesoxy- α,α -trehalose (IV)

Nach dem ad II beschriebenen Verfahren gewinnt man aus 1,4 g III in 15 cm³ abs. Äthanol und 5 cm³ 0,2 M-CH₃ONa ein Produkt (Ausbeute = ca. 100 %) mit Schmp. = 270—272 °C (EtOH + Et₂O); $[\alpha]$ (in H₂O) = + 181,4°. Im Hydrolysat von IV kann man chromatographisch (α) die Anwesenheit von D-Chinovose ($R_F = 0,31$) feststellen. Literatur [15] gibt Schmp. = 270—272 °C; $[\alpha]$ (23 °C; in H₂O) = + 185° an.

Herstellung der Enzyme

Trehalase aus *Saccharomyces cerevisiae* (CCY 21-4-13) wurde aus Zellenextrakt durch fraktionierte Fällung ((NH₄)₂SO₄), kombinierte mit Chromatographie auf DEAE-Celulose [16] und mit affiner Chromatographie auf Sepharose-Säule (mit immobilisiertem Concanavalin-A) hergestellt [17]. Die spezifische Aktivität des gewonnenen Produkts war 25 nkat mg⁻¹.

Trehalase aus *Aureobasidium pullulans* (CCY 27-1-37) wurde nach dem in [18] beschriebenen Verfahren hergestellt. Die spezifische Aktivität des gewonnenen Produkts war 19 nkat mg⁻¹.

Die Herstellung der Trehalase aus dem Thorax der Bienen wurde nach [19] durchgeführt. Die spezifische Aktivität des gewonnenen Produkts war 11 nkat mg⁻¹.

Enzymatische Hydrolyse

Die Geschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse der α,α -Trehalose und ihrer Desoxyderivate durch Einwirkung der Trehalase aus *Saccharomyces cerevisiae* und aus dem Thorax der Bienen wurde im Phosphat-Puffer bei pH = 6,45 (30 °C) (80 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) [20], während bei Verwendung der Trehalase aus *Aureobasidium pullulans* bei pH = 4,0 (30 °C) (80 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) verfolgt.

Dem entsprechenden Puffer (1 cm³) wurde 10 μmol α,α -Trehalose bzw. ihres Desoxyderivats hinzugefügt und nach Auftemperieren initiierte man die Hydrolyse durch Zu-

gabe des Enzyms ($\sim 20 \mu\text{g}$ des Enzymproteins in $0,05 \text{ cm}^3$ des entsprechenden Puffers). In bestimmten Zeitintervallen ($t = 0 \rightarrow 25 \text{ h}$) entnimmt man dem Reaktionsgemisch aliquote Anteile ($0,02 \text{ cm}^3$) und der Reaktionsverlauf wird chromatographisch (b), kolorimetrisch [20], mit Glucose-Oxidase- und Peroxidasetest unter Verwendung des 2,2'-Azino-di(3-äthylbenzthiazolon)-6'-sulfonats [21] bei der Wahl von spezifischen inneren Standards für die betreffende Gattung des entstehenden Reaktionsprodukts verfolgt.

Die Messungen haben wir auch mit spezifisch markierten radioaktiven Substraten bei Anwendung von $0,2 \text{ cm}^3$ der Ausgangsprobe durchgeführt, wobei in einzelnen Fällen die spezifische Aktivität auf 200 kBq mg^{-1} eingestellt war. Nach Beseitigung der nicht-reagierten Ausgangsverbindungen (chromatographisch) von den Reaktionsprodukten haben wir diese chromatographisch (c) bestimmt.

Der angegebene Zahlenwert $v_{r,0}$ ist die relative Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse, extrapolierte für $t = 0$ und bezogene auf die Geschwindigkeit der Hydrolyse von α,α -Trehalose = 1.

Bei der Bestimmung der Michaelis-Konstanten (K_m) und der maximalen Geschwindigkeiten ($v_{\max}$) verwendeten wir Lösungen in $0,001\text{--}0,08 \text{ mol dm}^{-3}$ Konzentrationen der α,α -Trehalose bzw. ihrer Mono- und Didesoxyderivate, wobei unter den bei radiometrischer Methode angegebenen Bedingungen die Reaktionsdauer 30 min betrug. Die Berechnung der K_m - und $v_{\max}$ -Werte wurde nach der "Direct Linear Plot"-Methode durchgeführt [22].

Literatur

1. Zemek, J., Farkaš, V., Biely, P. und Bauer, Š., *Biochim. Biophys. Acta* 252, 432 (1971).
2. Zemek, J., Kučár, Š. und Bauer, Š., *Eur. J. Biochem.* 40, 195 (1973).
3. Zemek, J. und Bauer, Š., *Biochim. Biophys. Acta* 264, 393 (1972).
4. Farkaš, V., Bauer, Š. und Zemek, J., *Biochim. Biophys. Acta* 184, 77 (1969).
5. Zemek, J., Strmeň, J., Kučár, Š. und Bauer, Š., *Eur. J. Biochem.* 64, 283 (1976).
6. Zemek, J., Kučár, Š., Zámocký, J. und Augustin, J., *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* 44, 1992 (1979).
7. Zemek, J. und Kučár, Š., *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* (im Druck).
8. Zemek, J., Kučár, Š. und Zámocký, J., *Eur. J. Biochem.* 89, 291 (1978).
9. Ježo, I. und Zemek, J., *Chem. Zvesti* 38, 715 (1984).
10. Ježo, I. und Zemek, J., *Chem. Papers* 40, 839 (1986).
11. Defaye, J., Dríguez, H., Henrissat, B. und Bar-Guilloux, E., *Carbohydr. Res.* 124, 265 (1983).
12. Guilloux, E. R., Defaye, J., Bell, R. H. und Horton, D., *Carbohydr. Res.* 20, 421 (1971).
13. Guilloux, E. R., Arcila, M. A., Courtois, J. E. und Moumrikoff, V., *Biochimie* 53, 853 (1971).
14. Ježo, I., *Chem. Zvesti* 25, 364 (1971).
15. Birch, G. G., *J. Chem. Soc. C1966*, 1072.
16. Solingen van P. und van der Laat, J. B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62, 553 (1975).
17. Kelly, P. J. und Catley, B. J., *Anal. Biochem.* 72, 353 (1976).
18. Merdinger, E., Lange, C. F. und Booker, B. F., *J. Bacteriol.* 106, 1034 (1971).
19. Talbot, B. G., Muir, J. G. und Huber, R. E., *Can. J. Biochem.* 53, 1106 (1975).

20. Somogyi, M., *J. Biol. Chem.* 12, 195 (1952).
21. Bergmeyer, H. V. und Bernt, E., *Methoden der enzymatischen Analyse*, Bd. II, S. 1172. (Bergmeyer, H. V., Editor.) Verlag Chemie, Weinheim 1970.
22. Eisenthal, R. und Cornish-Bowden, A., *Biochem. J.* 139, 715 (1974).

Übersetzt von I. Ježo