

This article was downloaded by:

On: 23 January 2011

Access details: *Access Details: Free Access*

Publisher *Taylor & Francis*

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Journal of Carbohydrate Chemistry

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713617200>

Stereochemie der Enzymatischen Hydrolyse von Saccharose und Raffinose Durch Invertase

R. Wajda^a; H. Friebolin^a

^a Organisch-Chemisches Institut der Universität, Heidelberg 1

To cite this Article Wajda, R. and Friebolin, H.(1986) 'Stereochemie der Enzymatischen Hydrolyse von Saccharose und Raffinose Durch Invertase', *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 5: 2, 241 – 247

To link to this Article: DOI: 10.1080/07328308608062963

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/07328308608062963>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

STEREOCHEMIE DER ENZYMATISCHEN HYDROLYSE VON SACCHAROSE
UND RAFFINOSE DURCH INVERTASE

R. Wajda und H. Friebolin *

Organisch-Chemisches Institut der Universität,
Im Neuenheimer Feld 270, D-6900 Heidelberg 1

Received December 10, 1985 - Final Form February 26, 1986

ABSTRACT

The stereochemistry of the enzymatic cleavage of saccharose and raffinose by invertase from *Candida utilis*, β -D-fructofuranoside fructohydrolase (EC 3.2.1.26), was investigated. The experiments show that both substrates are cleaved under retention of configuration: fructose will be released as β -fructofuranose; the other products of the hydrolysis - glucose from saccharose and melibiose from raffinose - have the α -configuration. β -Fructopyranose and β -glucose/ β -melibiose will be formed by mutarotation.

EINFÜHRUNG

Eine der am längsten bekannten enzymkatalysierten Reaktionen ist die Hydrolyse von Saccharose durch das Enzym Invertase, β -Fructofuranosidase (EC 3.2.1.26). Es darf als gesichert gelten, daß die Glucose dabei in der α -Pyranoseform entsteht,¹ es ist aber experimentell noch nicht eindeutig geklärt, in welcher Form die Fructose primär freigesetzt wird. Sie soll jedoch nach der Spaltung als β -Fructofuranose vorliegen, wie in einigen Arbeiten berichtet wurde.²⁻⁷ Da die bisher zum Thema der Stereochemie von Glykosidase-reaktionen veröffentlichten NMR-Arbeiten diese Frage unberücksichtigt ließen,⁸⁻¹¹ berichten wir in der vorliegenden Arbeit über unsere speziell unter diesem Gesichtspunkt durchgeführten ¹H-NMR-

spektroskopischen Untersuchungen zur Spaltung von Saccharose durch Invertase aus *Candida utilis*.

Als zweites Beispiel wählten wir die entsprechende Hydrolyse von Raffinose, einem Trisaccharid, bei dem die Saccharose um eine Galactoseeinheit verlängert ist. Wie bei der Saccharosespaltung war auch Ziel dieses Experimentes: In welcher Form entsteht die Fructose, und in welcher Konfiguration wird die Melibiose freigesetzt?

Um diese stereochemischen Probleme zu lösen, beschritten wir folgenden Weg¹²: Das Substrat sollte mit hoher Enzymaktivität bei möglichst tiefer Temperatur (ca. 0° C) innerhalb weniger Minuten gespalten sein. Damit wollten wir erreichen, daß einmal im Spektrum keine Signale mehr vom Substrat erscheinen und zum anderen die Umwandlungen der verschiedenen tautomeren Formen der Fructose verlangsamt werden.

Diese Experimente sollen zur Aufklärung des immer noch weitgehend ungeklärten Reaktionsmechanismus beitragen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fig. 1 und 2 zeigen Spektrenausschnitte der Reaktionslösungen, aufgenommen unmittelbar nach beendeter Spaltung (unten), während der Gleichgewichtseinstellung (Mitte) und im Gleichgewicht (oben). Abgebildet ist jeweils nur der Bereich, in dem die für unsere Fragestellung interessanten charakteristischen Signale liegen: von H-3 und H-4 der β -Fructofuranose ($\delta = 4.11$ und 4.10) und von H-5 und H-6e der β -Fructopyranose ($\delta = 3.95$ bis 4.05 ; Zuordnung nach ¹³).

SACCHAROSE: Aus den Spektren (Fig. 1) folgt: Direkt nach beendeter Spaltung sind nur Signale von Fructose in der β -Furanoseform erkennbar (unten); das primär nachweisbare Spaltprodukt ist somit β -Fructofuranose, von der wir daher annehmen, daß sie primäres Spaltprodukt ist. Grundsätzlich käme hierfür auch die Fructose in der offenkettigen Ketoform in Frage. Nach den kürz-

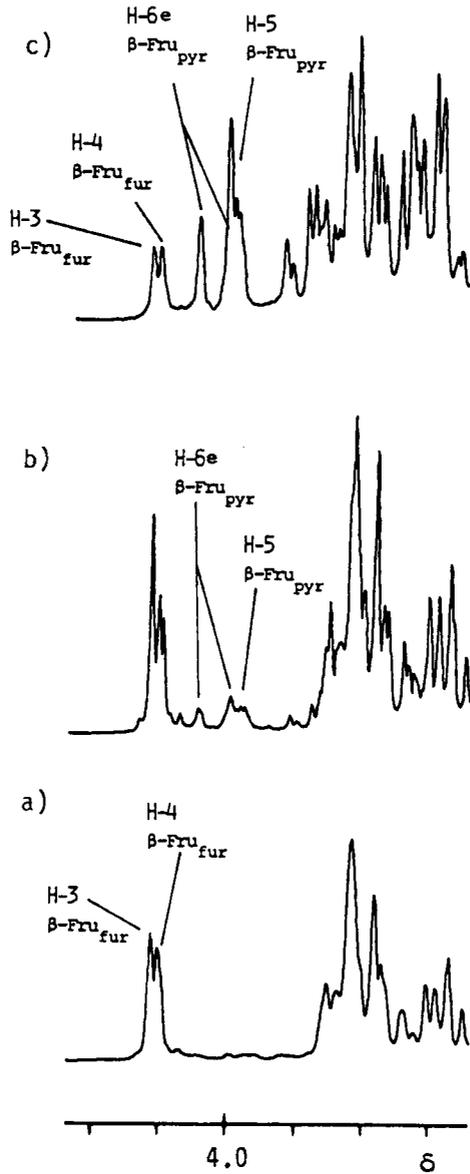


Fig. 1:

Spektrenausschnitte (300 MHz) einer Inkubationslösung von 29 μ mol Saccharose und 850 U Invertase in 10 mM Na-Acetatpuffer pH 5.0, 8K Datenpunkte.
 a) nach 3.5 min, 0°C, 8 Impulse
 b) nach 16 min, 0°C, 8 Impulse
 c) Gleichgewicht, 21°C, 656 Impulse.

lich von Goux ¹⁴ aus ¹³C-NMR-Spektren ermittelten kinetischen Daten sollten sich aber in diesem Fall nach beendeter Spaltung sehr schnell α - und β -Fructofuranose im Verhältnis von ungefähr 1:4 bilden. Wir finden jedoch in keinem der Spektren Signale der α -Fructofuranose; wir schließen deshalb Fructose in der offenkettigen Form als primäres Spaltprodukt aus.

Durch Mutarotation bildet sich aus der β -Fructofuranose danach β -Fructopyranose, deren Signale ($\delta = 3.95$ bis 4.05) sich bis zum Erreichen des Gleichgewichtes verstärken (oben).

Die Spaltung der Saccharose durch Invertase erfolgt somit unter Retention der Konfiguration an C-2 der Fructose.

Mit diesem Experiment konnten wir auch die bisherigen Befunde bestätigen, daß Glucose bei der Hydrolyse in der α -Konfiguration entsteht. In dem nach 3.5 min aufgenommenen Spektrum (in Fig. 1 nicht abgebildet) erscheint für H-1 von Glucose nur ein Dublett bei $\delta = 5.23$ mit der Kopplungskonstante $J(1,2) = 3.7$ Hz.

RAFFINOSE wird durch Invertase in Fructose und Melibiose gespalten. Obwohl Signalüberlappungen die Auswertung etwas erschweren (Fig. 2), ist das Ergebnis ebenfalls eindeutig: Als primäres Spaltprodukt entsteht β -Fructofuranose; die Spaltung erfolgt somit - wie bei der Saccharose - unter Retention der Konfiguration an C-2 der Fructose. β -Fructopyranose bildet sich anschließend durch Mutarotation. Das zweite Spaltprodukt, die Melibiose, wird in der α -Konfiguration freigesetzt, wie aus dem Dublett für das anomere Proton H-1 bei $\delta = 5.24$ mit $J(1,2) = 3.8$ Hz folgt (nicht abgebildet).

Die Ergebnisse unserer Experimente sind in dem folgenden Reaktionsschema zusammengefaßt; als primäre Spaltprodukte entstehen:



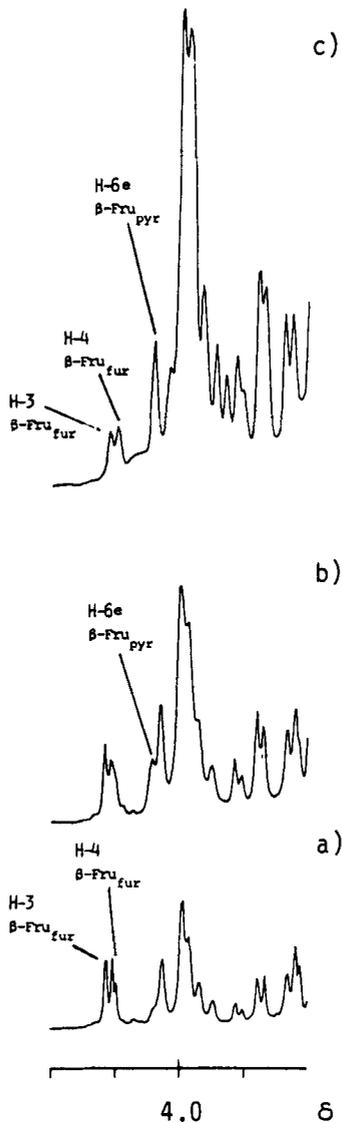
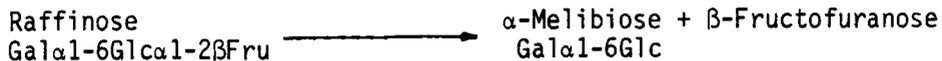


Fig. 2:

Spektrenausschnitte (300 MHz) einer Inkubationslösung von 20.2 μmol Raffinose und 1700 U Invertase in 10 mM Na-Acetatpuffer pD 5.0, 8K Datenpunkte. a) nach 3 min, 0°C, 8 Impulse b) nach 23 min, 0°C, 8 Impulse c) Gleichgewicht, 20°C, 200 Impulse.

EXPERIMENTELLER TEIL

Substrate und Enzyme. Saccharose, Raffinose, Invertase aus *Candida utilis* und D_2O (99.8%) stammen von der Fa. Sigma GmbH, München, Essigsäure- d_4 von der Fa. Merck, Darmstadt.

Spaltansätze. Invertase konnte als Lyophilisat eingesetzt werden. Dabei wurden 29 μmol Saccharose bzw. 20.2 μmol Raffinose mit 850 bzw. 1700 Einheiten Invertase versetzt. Als Lösung diente 10 mM Na-Acetatpuffer pD 5.0. Bei allen Spaltansätzen betrug das Probevolumen 0.5 ml.

^1H -NMR-Spektroskopie. Alle Messungen wurden mit einem Spektrometer vom Typ WH 300 (Meßfrequenz 300 MHz) der Fa. Bruker, Karlsruhe-Rheinstetten, durchgeführt. Die Meßbedingungen sind den Legenden von Fig. 1 und 2 zu entnehmen. Als innerer Standard diente Trimethylsilyl-Na-propionat- d_4 (TSP).

DANKSAGUNG

Wir danken Herrn Dr. W. Baumann, Organisch-Chemisches Institut der Universität Heidelberg, für seine Hilfe bei den NMR-Messungen, Herrn Dr. D. Ziegler, Institut für Biochemie II, Med. Fak. der Universität Heidelberg, für viele Diskussionen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für ihre finanzielle Unterstützung.

LITERATUR

1. F. W. Parrish und E. T. Reese, Carbohydr. Res., **3**, 424 (1967).
2. C. S. Hudson, J. Am. Chem. Soc., **31**, 655 (1909) und **52**, 1707 (1930).
3. K. Bailey und R. H. Hopkins, Biochem. J. **27**, 1957 (1933).
4. J. S. D. Bacon und D. J. Bell, J. Chem. Soc. (1957) 3581.
5. B. Andersen und H. Degn, Acta Chem. Scand., **16**, 215 (1962).
6. R. S. Shallenberger, Pure and Appl. Chem., **50**, 1409 (1978).

7. R. S. Shallenberger, S. E. Braverman und W. E. Guild jr., Food Chem., 5, 207 (1980).
8. D. E. Eveleigh und A. S. Perlin, Carbohydr. Res., 10, 87 (1969).
9. N. Shimoni und J. Yamada, Carbohydr. Res., 111, 175 (1982).
10. P. A. J. Gorin, J. F. T. Spencer und D. E. Eveleigh, Carbohydr. Res., 11, 387 (1969).
11. I. V. Vikha, V. G. Sakharovsky, V. F. Bystrov und A. Y. Khorlin, Carbohydr. Res., 25, 143 (1972).
12. R. Wajda, Dissertation Universität Heidelberg (1985).
13. G. A. Morris und L. D. Hall, J.Am.Chem.Soc., 103, 4703 (1981).
14. W. J. Goux, J.Am.Chem.Soc., 107, 4320 (1985).