

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right) \cdot [S]}$$



© L. Könighofer

J. Kaeswurm, L. Könighofer, M. Hogg, A. Scharinger, M. Buchweitz

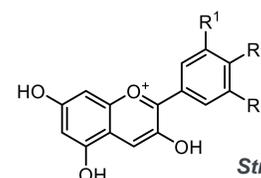
Untersuchungen der Interaktion von Anthocyanen mit α -Amylase

Einleitung

Anthocyane (ACY), sind wasserlösliche, rote und blaue Pflanzenfarbstoffe in vielen Blüten und Früchten. Die über 900 bekannten ACY unterscheiden sich durch die Anzahl der Hydroxy- und Methoxygruppen am Aglykon und/oder dem Glykosylrest. Allerdings besitzen fast 90% aller ACY ein, von Struktur 1, ableitbares Aglykon.^[1]

Für ACY wird ein suppressiver Effekt auf die postprandiale Aufnahme von Glucose postuliert.^[2] Als einer der Gründe hierfür gilt ihre inhibitorische Wirkung auf Verdauenzymen, wie α -Amylase und α -Glucosidasen.^[2, 3] Eine Hemmung dieser Enzyme und die somit verringerte bzw. verlangsamte Aufnahme von Glucose, ist ein Ansatz zu Regulierung des Blutzuckerspiegels, z.B. mit dem Medikament Acarbose. Acylierte ACY aus Gemüse gelten als besonders gute Inhibitoren der α -Glucosidasen.^[2] Bislang gibt es jedoch kaum Studien, welche den Effekt von acylierten ACY auf α -Amylase untersuchen.

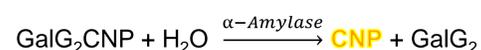
Eigene Forschungsdaten zeigen, dass monoacylierte ACY der Schwarzen Karotte den gastrischen Verdau intakt passieren und somit im Darm für die Interaktion mit den stärkeabbauenden Enzymen zur Verfügung stehen.^[4]



Struktur 1

Aglyka	R ¹	R ²	R ³
Pelargonidin (Plg)	H	OH	H
Cyanidin (Cyd)	OH	OH	H
Delphinidin (Dpd)	OH	OH	OH
Peonidin (Peo)	OMe	OH	H
Petunidin	OMe	OH	OH
Malvidin (Mlv)	OMe	OH	OMe

Reaktionsgleichung des Enzymassays:



Zielsetzung

- Bestimmung des Einflusses der Aglykonstruktur auf die Hemmung der pankreatischer α -Amylase des Schweins, mittels eines Enzymaktivitätsassays (Substrat: 2-Chloro-4-Nitrophenyl-4-Galactomaltose (GalG₂CNP)). Die Detektion erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie (bei 405 nm) und Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) (single injection experiment).
- Vergleich der Hemmstärke zwischen kommerziell erhältlichen nicht acylierten Standardsubstanzen und den überwiegend monoacylierten ACY der Schwarzen Karotte (*Daucus carota ssp. Sativus var. Atrorubens* Alef).

Ergebnisse

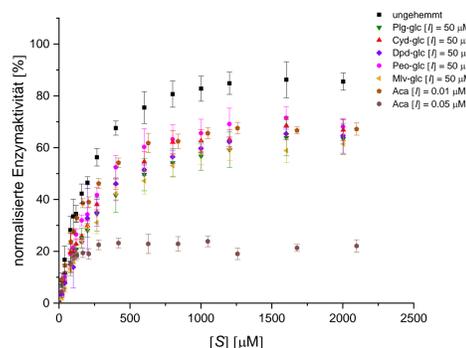
1. Hemmkonstanten (UV/Vis) – Standardsubstanzen

Substanz	K _{ic} [μM]	K _{iu} [μM]	K _{ic} /K _{iu}	IC ₅₀ [S]=1 M
Acarbose	4 ± 5	0,02 ± 0	218,2 ± 295,8	0,02 ± 0,00
Plg-3-glc	57 ± 15 ^a	151 ± 59 ^a	0,39 ± 0,05 ^a	151 ± 59 ^a
Cyd-3-glc	81 ± 10 ^a	184 ± 56 ^a	0,45 ± 0,08 ^a	184 ± 56 ^a
Peo-3-glc	109 ± 39 ^a	258 ± 78 ^a	0,42 ± 0,02 ^a	258 ± 78 ^a
Mlv-3-glc	44 ± 4 ^a	143 ± 44 ^a	0,32 ± 0,07 ^a	143 ± 43 ^a
Dpd-3-glc	62 ± 25 ^a	204 ± 68 ^a	0,34 ± 0,24 ^a	203 ± 68 ^a

Bedingungen entsprechen [3]; K_{ic}: Hemmkonstante der kompetitiven Hemmung, K_{iu}: Hemmkonstante der nicht-kompetitiven Hemmung, die Signifikanz wurde mittels Tukey's Test berechnet, eine Signifikanz wurde ab p < 0,05 angenommen.

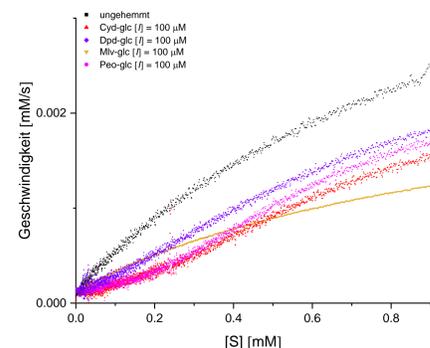
→ Alle ACY zeigten eine nicht-kompetitive Hemmung, mit einem dominanten kompetitiven Anteil (K_{ic}/K_{iu} < 1)

2. UV/Vis – Standardsubstanzen



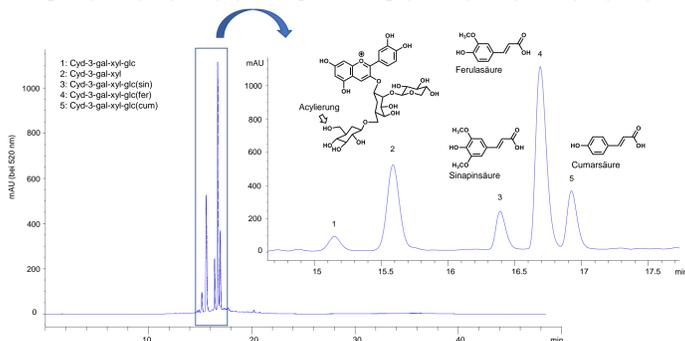
→ Die Hemmwirkung von nicht acylierten ACY (50 μM) entspricht ungefähr der von 0,01 μM Acarbose (Faktor 5.000)

3. ITC – Standardsubstanzen



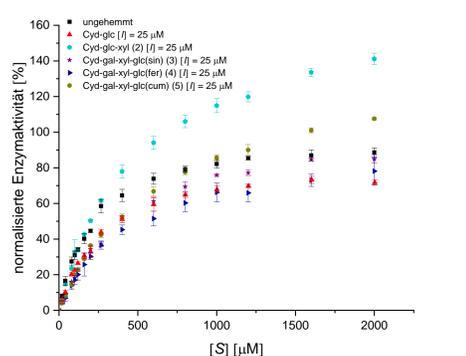
→ Kein signifikanter Unterschied in der Hemmstärke zwischen den untersuchten Aglyka

4. Strukturen der ACY in Schwarzer Karotte^[4]



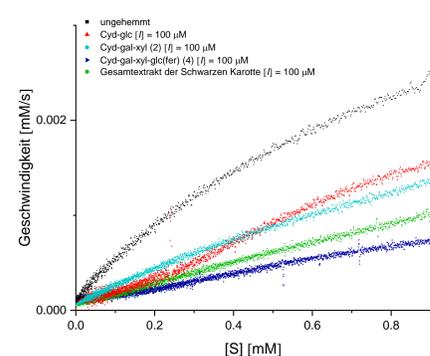
→ Anteilsbestimmung der ACY in Schwarzer Karotte durch Peakflächenvergleich im HPLC-Chromatogramm bei 520 nm: (1) Cyd-gal-xyl-glc 5%, (2) Cyd-gal-xyl 27%, (3) Cyd-gal-xyl-glc(sin) 10%, (4) Cyd-gal-xyl-glc(fer) 42% und (5) Cyd-gal-xyl-glc(cum) 15%

5. UV/Vis – Schwarze Karotte ACY



→ Inhibitorzugabe scheint die Enzymaktivität zu erhöhen
→ Widerspruch zu den Ergebnissen der ITC

6. ITC – Schwarze Karotte ACY



→ Alle ACY zeigen eine deutliche Hemmung, monoacylierte ACY bewirken jedoch eine verbesserte Wirkung als nicht acylierten ACY

Schlussfolgerungen

- ACY inhibieren grundsätzlich die α -Amylase, die Aglykonstruktur hat dabei keinen signifikanten Einfluss
- Die UV/Vis Detektion des Produkts und die Reaktionsverfolgung mittels ITC weisen für die kommerziell erhältlichen ACY-Glucoside identische Trends auf
- Die aus Schwarzer Karotte isolierten ACY-Strukturen zeigen bei der UV/Vis-Detektion bislang widersprüchliche und ungeklärte Ergebnisse, welche eine Erhöhung der Enzymaktivität suggerieren
→ Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur Reaktionsverfolgung mittels ITC, welche auf eine verbesserte Hemmung durch monoacylierte ACY-Strukturen hinweisen
- Laut den ITC-Daten sind die monoacylierten ACY-Strukturen der Schwarzen Karotte (insgesamt 67% aller ACY) stärkere Inhibitoren als die nicht acylierten Strukturen, wodurch der starke Hemmeffekt des Schwarzen Karotten Extraktes auf die α -Amylase erklärt werden kann

Referenzen

[1] O. M. Anderson & M. Jordheim, **2013**, Basic Anthocyanin Chemistry and Dietary Sources, in Anthocyanins in Health and Disease. CRC Press. [2] T. Matsui et al., **2001**, J. Agric. Food Chem. 1952-1956. [3] J. R. Homoki et al., **2015**, Food Chem. [4] L. Könighofer, **02/2018**, Masterarbeit Universität Stuttgart.

Kontakt: maria.buchweitz@lc.uni-stuttgart.de

Gefördert durch das Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst Baden-Württemberg, die Dr. Leni Schöninger Stiftung und Fonds der chemischen Industrie