

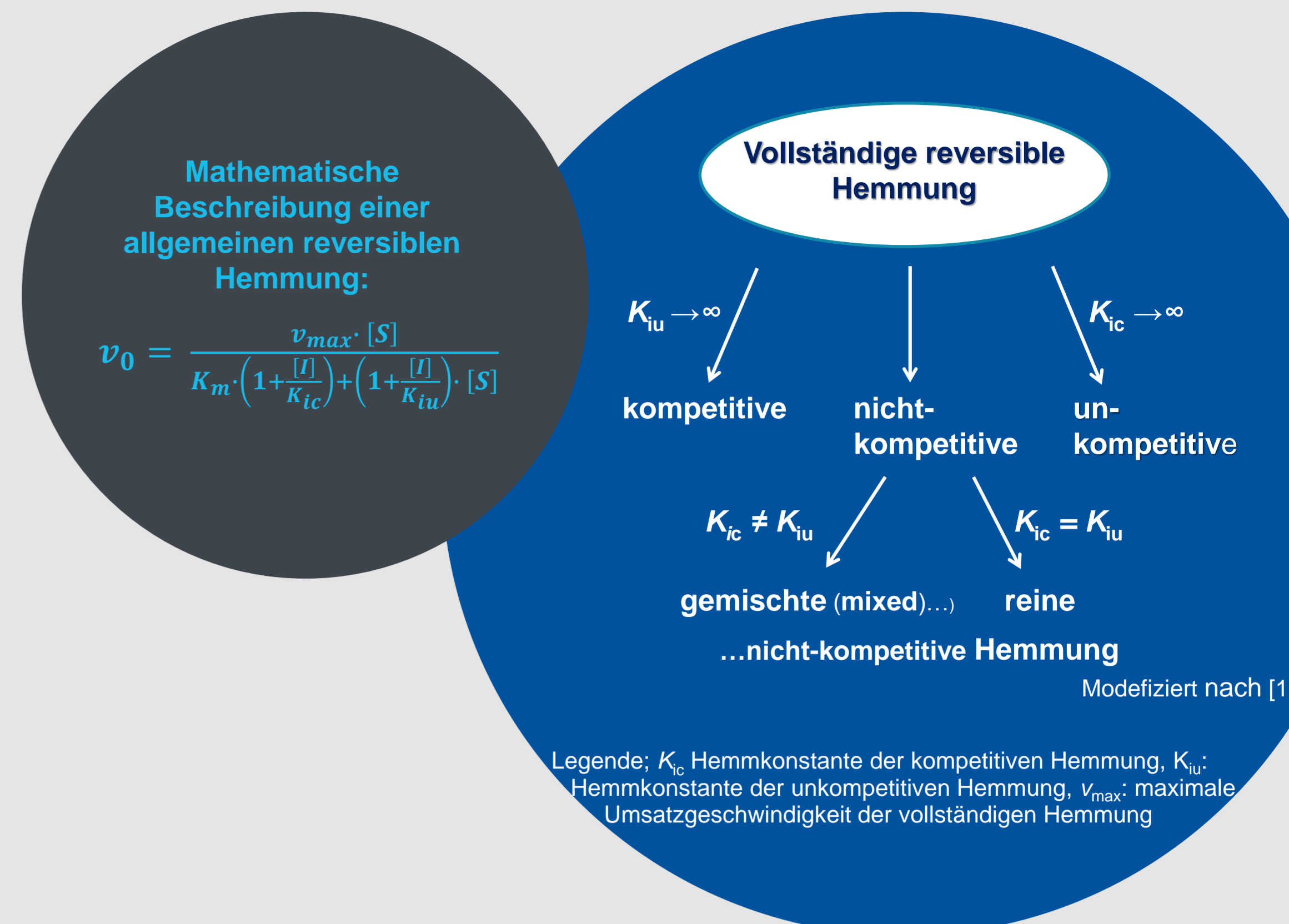
# Universität Stuttgart

Institut für Biochemie und Technische Biochemie

Abteilung Lebensmittelchemie

J. Kaeswurm, B. Claasen, M.-P. Fischer, M. Buchweitz

## Untersuchung der Interaktion von Polyphenolen mit $\alpha$ -Amylase



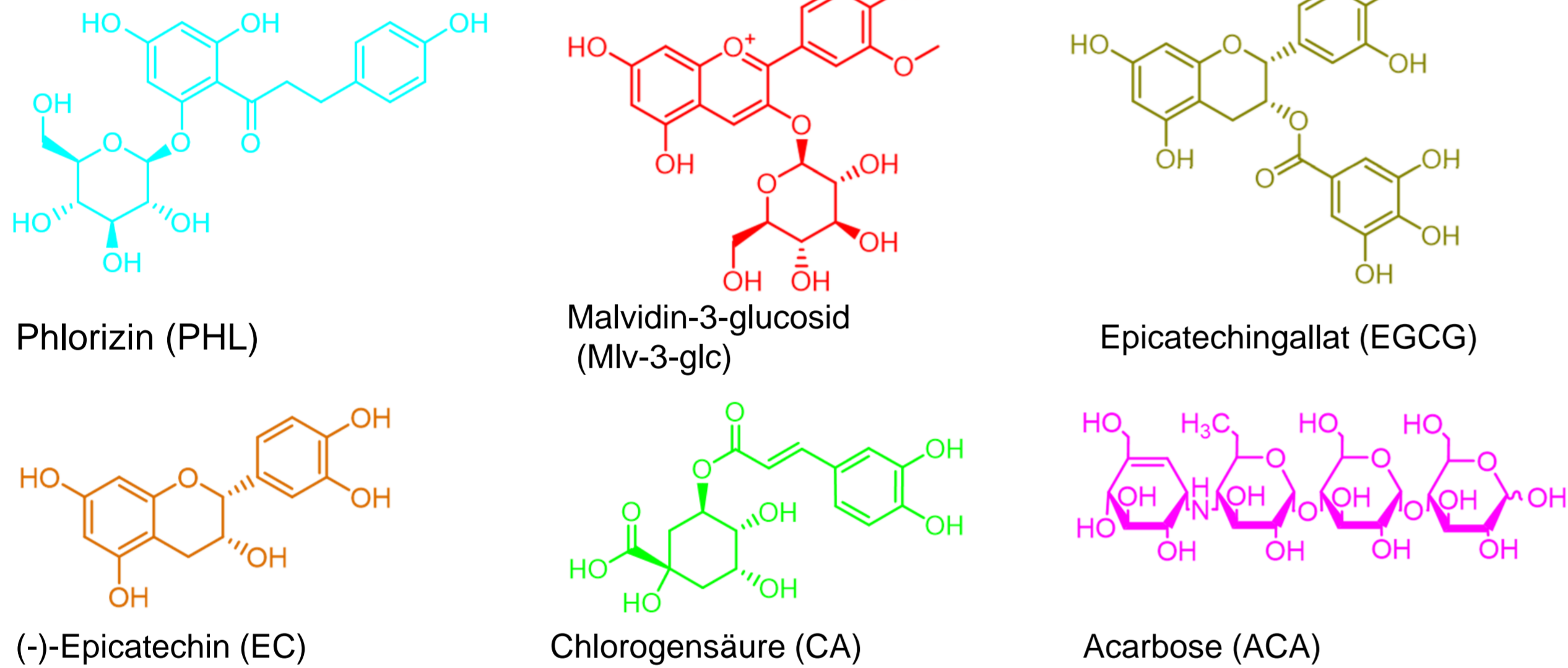
### Einleitung

Weltweit waren im Jahr 2017 ca. 451 Mio. Menschen an Diabetes Mellitus erkrankt.<sup>[1]</sup> Oft geht einer Diabetes Typ II eine Hyperglykämie, ein abnormer postprandialer Blutzuckerspiegel voraus. Polyphenole (PP) sind sekundäre Pflanzenstoffe und ubiquitär in unserer pflanzlichen Nahrung vorhanden. Hemmeffekte wichtiger Enzyme des Stärkeverbaus wie z.B.  $\alpha$ -Amylase durch PP sind bekannt. Deshalb wird ein positiver Effekt der PP auf den Blutzuckerspiegel postuliert.

### Zielsetzung

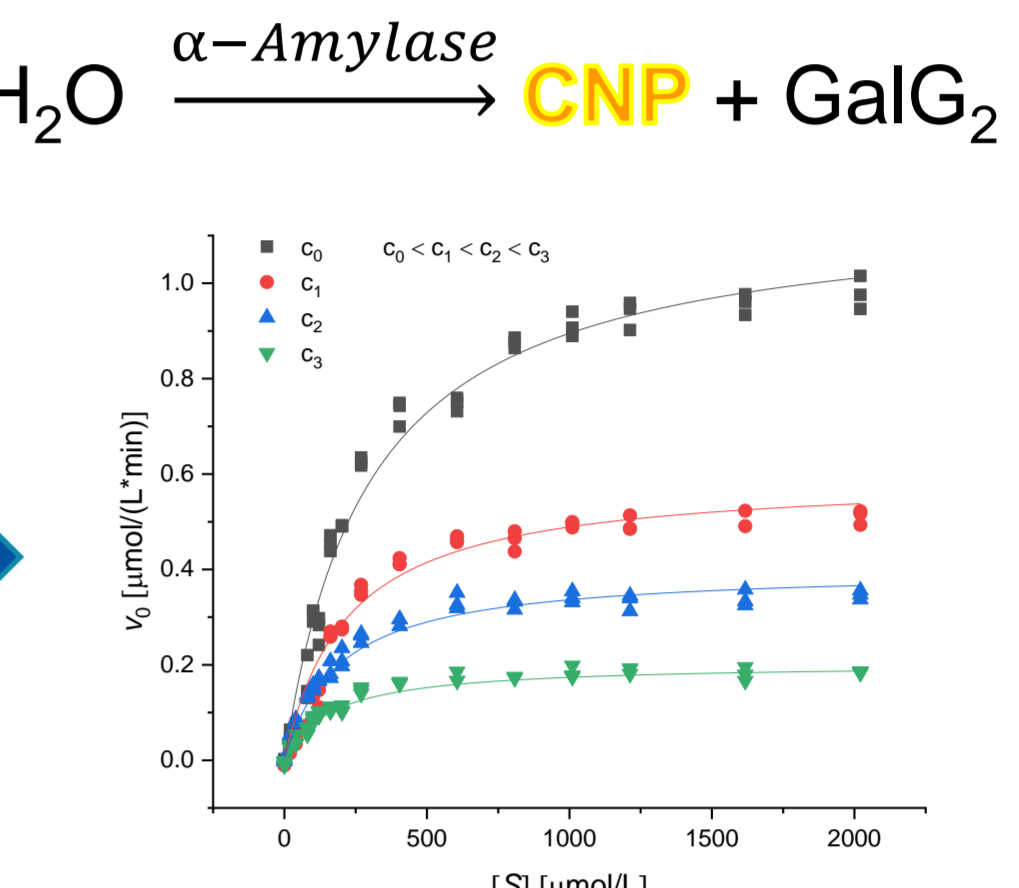
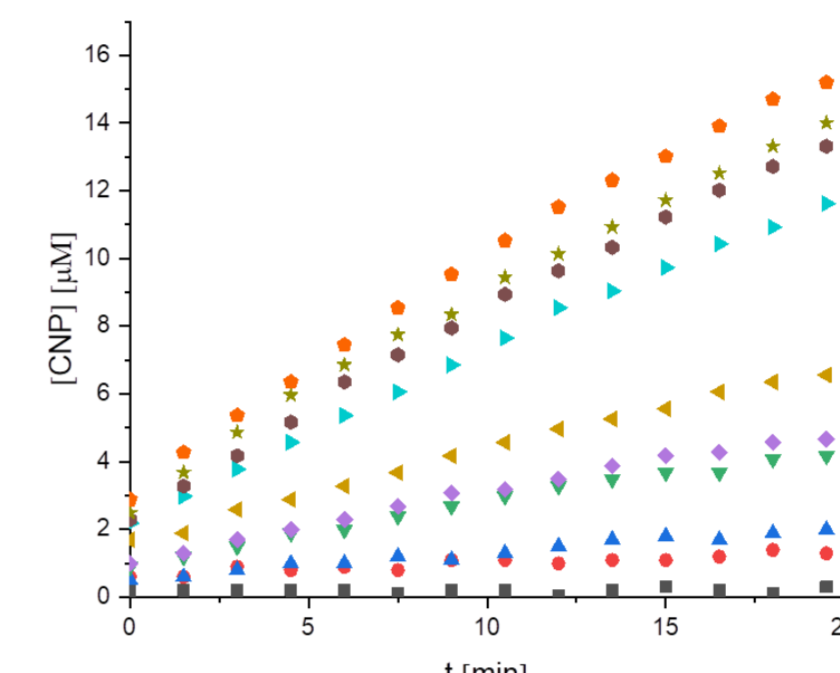
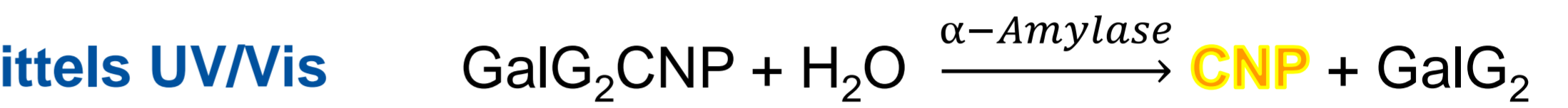
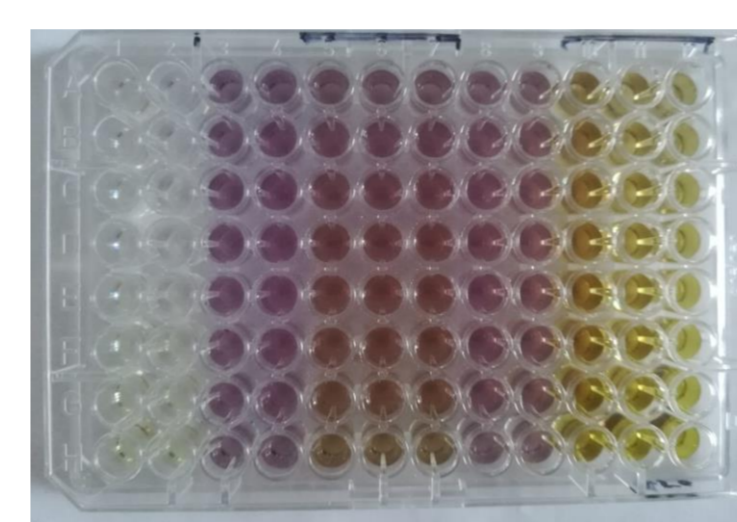
- Bestimmung des Hemmmechanismus und der Stärke der Hemmung mit unterschiedlichen Messmethoden
- Vergleich der Stärke mit Acarbose, einem als Medikament eingesetztem  $\alpha$ -Amylase und  $\alpha$ -Glucosidase Hemmer

### Verwendete Substanzen



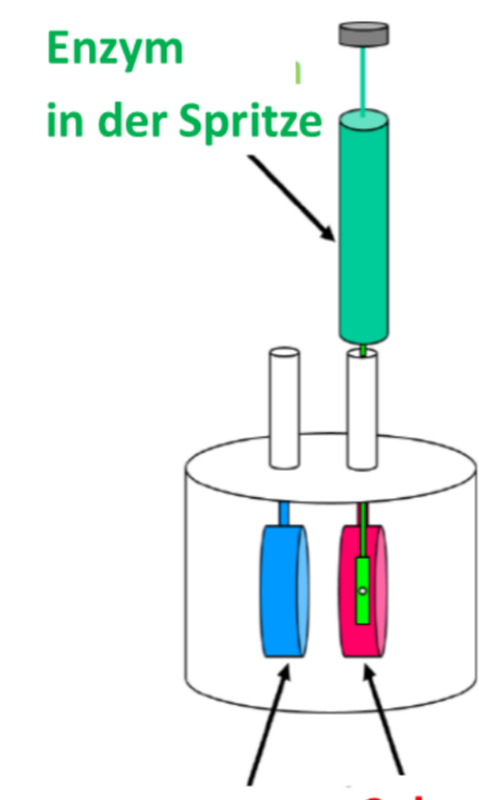
### Methoden

#### Enzymassay-Detektion mittels UV/Vis

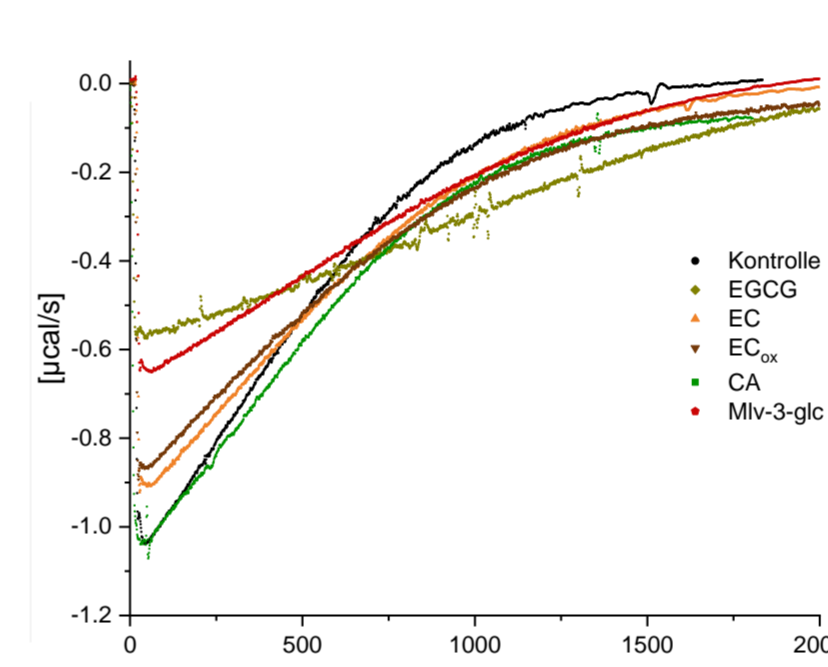


→ Bestimmung der Hemmkonstanten nach der Formel der allgemeinen reversiblen Hemmung

#### Enzymassay-Detektion mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC)



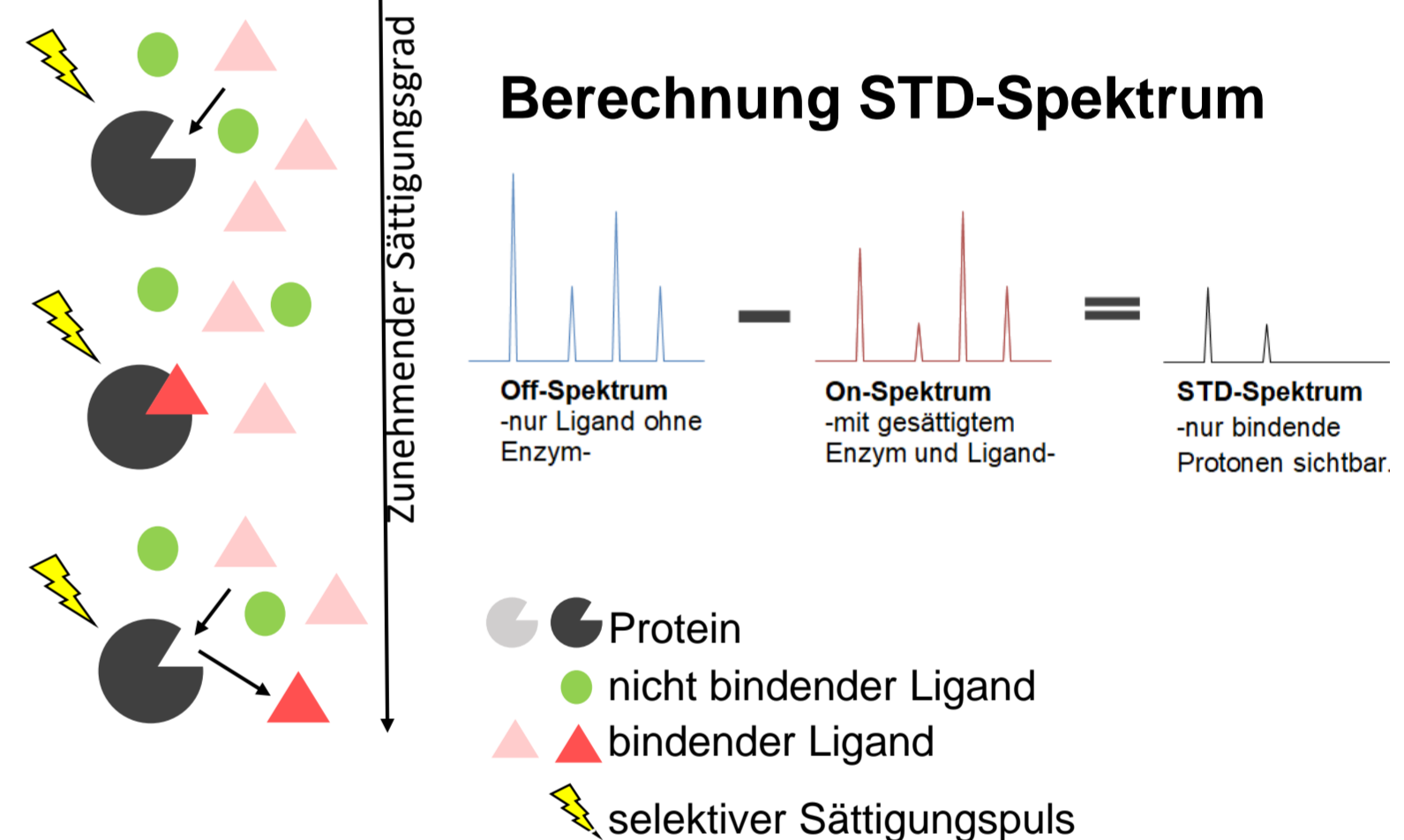
Verwendete Methode: Single injection experiment



- Reaktionswärme bei Zugabe des Enzyms wird gemessen
- $dQ/dt$  erlaubt Rückschluss auf das Bindungsverhalten

#### Saturation-Transfer-Difference (STD)-NMR

Protein wird mittels eines Puls abgesättigt. Dieser kann auf Bindungspartner (PP) übertragen werden



### Ergebnisse

#### Enzymassay – UV/Vis

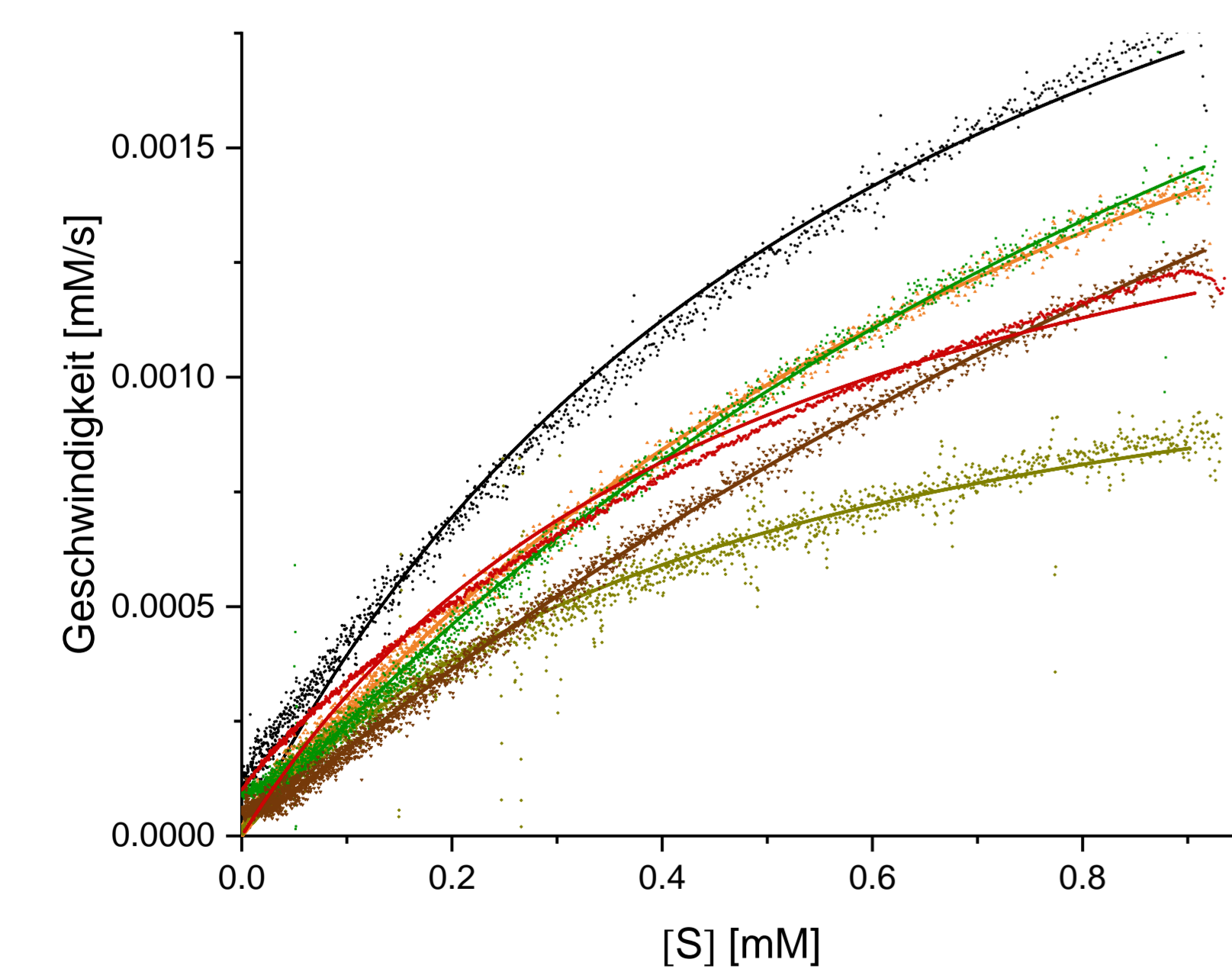
Alle PP zeigen eine nicht-kompetitive (mixed) Hemmung

Substanz	$K_{ic}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$K_{iu}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$K_{ic}/K_{iu}$	$IC_{50}$ [S]=1 M
ACA	4 ± 5	0,02 ± 0	218,2 ± 295,8 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>a</sup>
EGCG	121 ± 17	59 ± 6	2,06 ± 0,21 <sup>b</sup>	59 ± 6 <sup>a</sup>
Mlv-3-glc	44 ± 4	143 ± 44	0,32 ± 0,07 <sup>b</sup>	143 ± 43 <sup>ab</sup>
EC <sub>ox</sub> *	47 ± 43	241 ± 1	0,20 ± 0,18 <sup>b</sup>	241 ± 1 <sup>bc</sup>
EC	110 ± 9	475 ± 274	0,28 ± 0,18 <sup>b</sup>	240 ± 58 <sup>bc</sup>
PHL	155 ± 61	236 ± 190	0,51 ± 0,26 <sup>b</sup>	326 ± 80 <sup>d</sup>
CA	405 ± 89	437 ± 15	0,93 ± 0,24	437 ± 15 <sup>e</sup>

\*EC-Lösung für 18,5 h gerührt

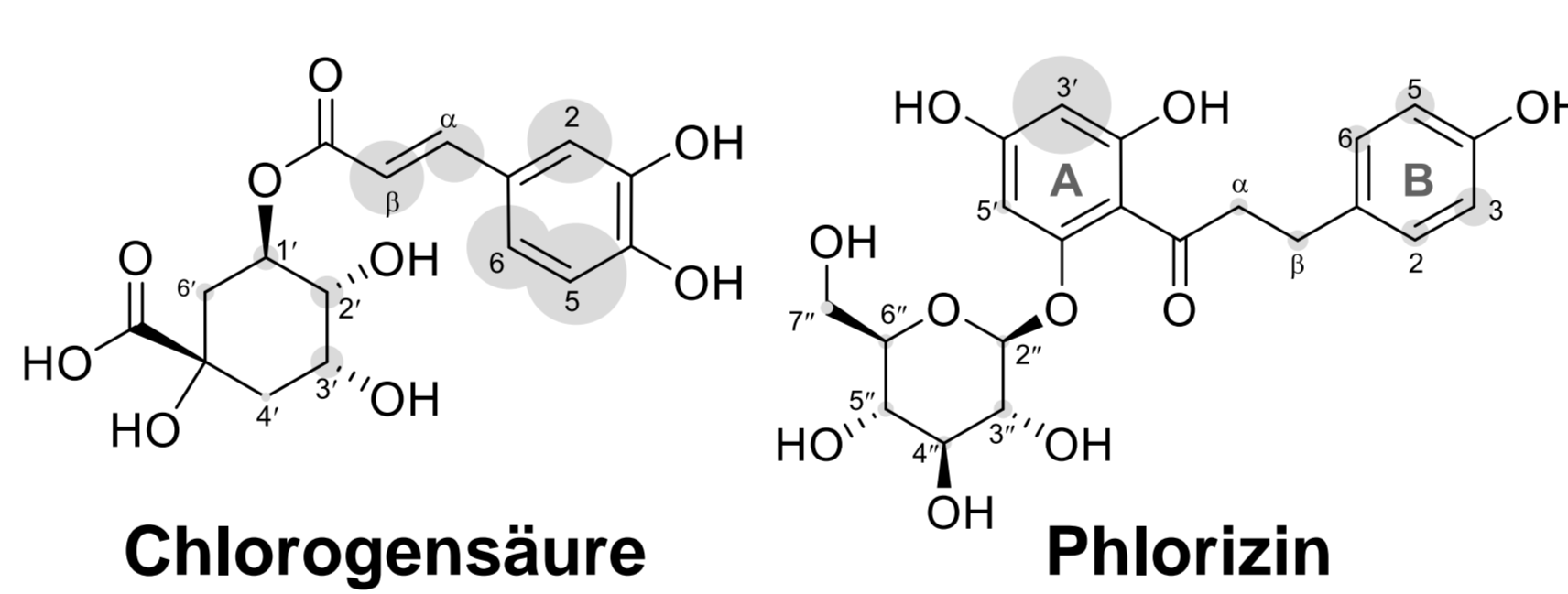
→ ACA >> EGCG > MLV-3-glc > EC<sub>ox</sub> > EC ~ PHL ~ CA

#### Enzymassay – ITC



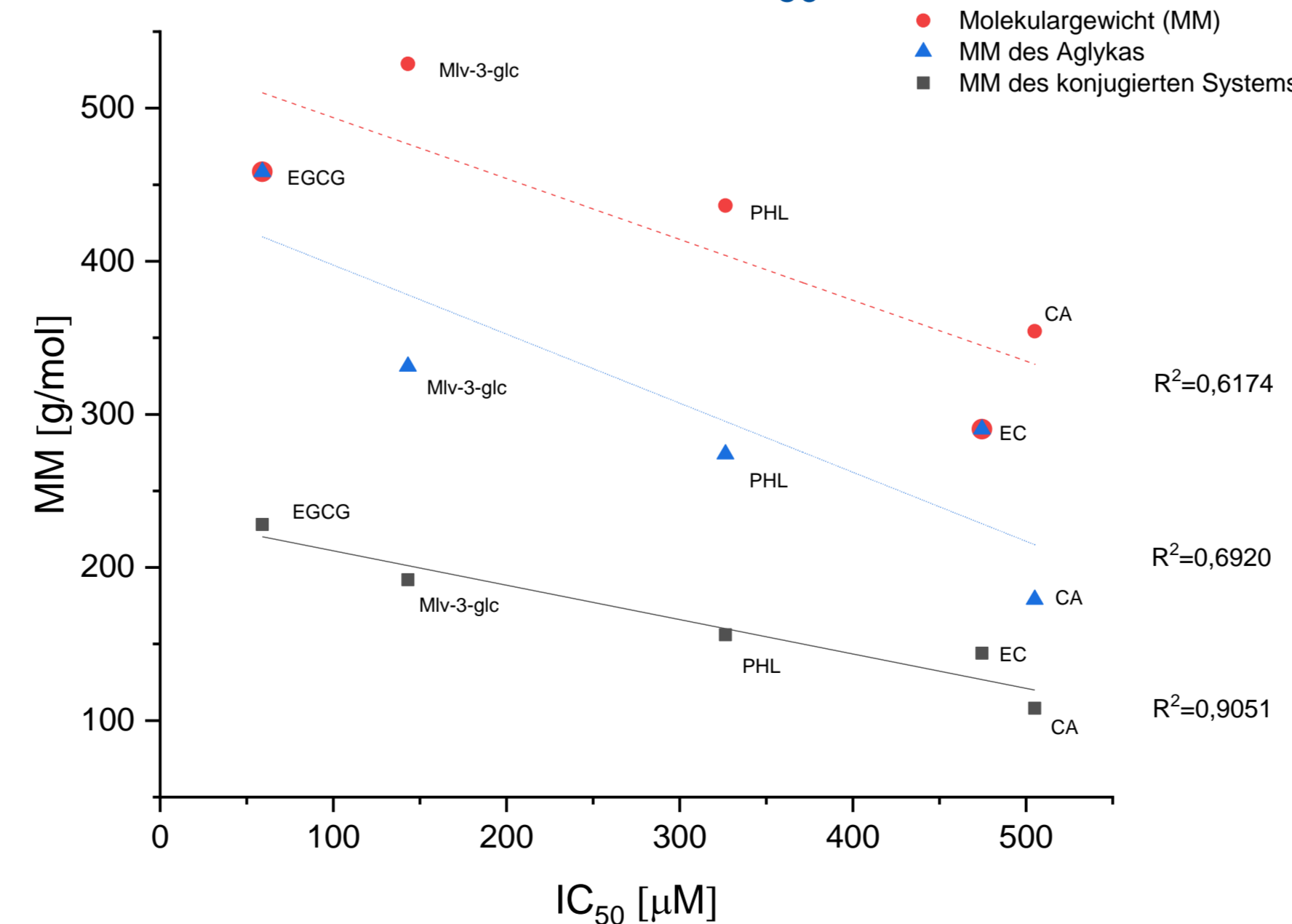
→ ACA >> EGCG > MLV-3-glc > EC<sub>ox</sub> > EC ~ CA

#### STD-NMR



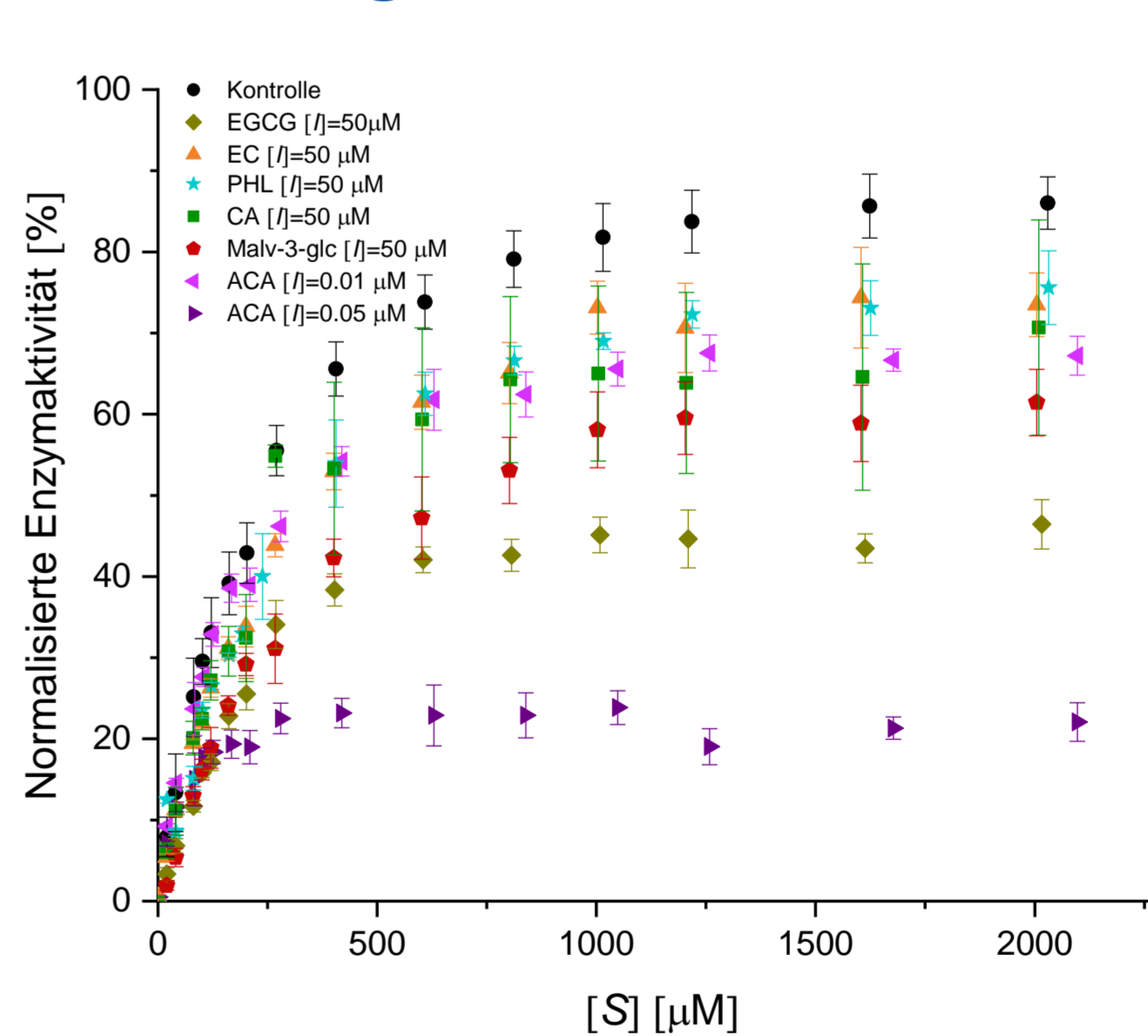
→ Bindungsepitop ist das konjugierte System  
→ Hydrophobe Interaktionen und  $\pi$ -Wechselwirkungen?

#### Einfluss der Struktur auf $IC_{50}$



→ Korrelation zwischen  $IC_{50}$  und molekulare Masse des konjugierten Systems des Aglykas

#### PP im Vergleich zu ACA



→ Verringerte Inhibitorwirkung bezogen auf ACA:

EGCG: 2.000  
Mlv-3-glc 5.000  
Andere: 10.000

#### Rechenbeispiel

**Acarbosedosis** für einen Diabetespatienten: 300 mg (= 465  $\mu\text{mol}$ )/ Tag [3]

Für vergleichbare Wirkung von EGCG: Faktor 2000 → 0,93 mol (= 425 g) EGCG

Durchschnittliche Polyphenol-aufnahme pro Tag: 1 g<sup>[4]</sup>

EGCG benötigt für medizinische Wirkung



#### Schlussfolgerung

- Der Effekt auf den Blutzuckerspiegel durch die  $\alpha$ -Amylase Hemmung ist begrenzt
- Aber Hemmung von Glucosidasen und Glucose Transporter durch PP im Darm sind bekannt

### Referenzen

- [1] H. Bisswanger 2000 Enzymkinetik: Theorie und Methoden. Willy-VCH. [2] N. H. Cho et al., 2018. Diabetes Res.Clin. Pra., 271-281. [3] Matsui, T.; et. al. 2001 J. Agric. Food Chem. 1948-1951. [4] A. Scalbert & G. Williamson, 2000 J. Nutr. 2073-2085.

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