

## 12. Enzyme

### 12.1 Enzyme als Biokatalysatoren

*Enzyme* haben die Aufgabe, die chemischen Reaktionen lebender Zellen zu katalysieren; alle normalen lebenden Zellen synthetisieren die für den Stoffwechsel notwendigen Enzyme selbst. Es sind echte Katalysatoren, d.h. sie beeinflussen nicht die Lage des Reaktionsgleichgewichtes, sondern beschleunigen nur die Reaktionsgeschwindigkeit durch Erniedrigung der Aktivierungsenergie des Übergangszustandes  $\Delta G^\ddagger$ , ohne bei der Reaktion selbst verbraucht zu werden. Enzyme beschleunigen die Reaktionen, indem sie zunächst das Substrat binden und so einen anderen Reaktionsweg (mit einem anderen Übergangszustand) mit stark erniedrigter Aktivierungsenergie schaffen (Abb. 12-1). Wird für die Katalyse eine niedermolekulare Verbindung benötigt, bezeichnet man den Proteinteil des Enzyms als *Apoenzym*, die niedermolekulare Verbindung als *Coenzym*. Beide zusammen bilden das *Holoenzym*. Im Unterschied zu den Katalysatoren sind Enzyme regulierbar, die *Wechselzahl*, d.i. die Anzahl Mole umgesetztes Substrat pro aktives Zentrum des Enzyms, kann bis zu  $10^5 \text{ s}^{-1}$  betragen.

*Abb. 12-1.* Freie Aktivierungsenergie  $\Delta G^\ddagger$  einer Umsetzung eines Substrates S zum Produkt P.

Die große Spezifität der Enzyme gegenüber einem bestimmten Substrat veranlasste E. FISCHER zu seinem bekannten Schlüssel-Schloss-Vergleich. Die Untersuchung der Enzyme und ihrer Wirkmechanismen gehört wegen der grundsätzlichen Bedeutung für die Aufklärung der Organisation des Lebens, für die Aufklärung und Beeinflussung pathologischer Erscheinungen z.B. des menschlichen Organismus und in zunehmenden Maße auch wegen ihrer Bedeutung für die industrielle Stoffumwandlungen zu den wichtigsten Teilgebieten der Biochemie. In den letzten Jahren gewinnen sie aufgrund ihrer Spezifität auch immer mehr auch als Analytik- und Synthesehilfsmittel für Naturstoffe und als Tools für die synthetische Stereochemie an Bedeutung.

Unter den chemischen Methoden, die zur Untersuchung von Enzymmechanismen herangezogen werden, sind der Einsatz von Substrat- oder Coenzym-Analogen und die chemische Modifizierung von Aminosäuren im aktiven Zentrum von besonderer Bedeutung.

## 12.2 Bau der Enzyme

Enzyme sind meist globuläre Proteine, die von einer oder mehreren Polypeptidketten gebildet werden und aus mehreren gleichen oder verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sein können. Zu der zweiten Gruppe gehören die *Multienzym-Komplexe*, bei denen mehrere Enzyme als Untereinheiten in einem konstanten Mengenverhältnis eine geordnete Quartärstruktur bilden. Hierbei handelt es sich häufig um Enzyme, die aufeinanderfolgende Reaktionsschritte katalysieren wie z.B. der Fettsäure-Synthetase-Komplex (2. ). Die Ausbildung von Multienzym-Komplexen bietet offensichtlich Vorteile gegenüber einem einzelnen globulären Enzym. So wird vermutet, dass die enzymatisch aktive Konformation der einzelnen Untereinheiten durch die Komplexbildung stabilisiert wird.

*Multifunktionelle Enzyme* üben wie die Multienzym-Komplexe mehrere katalytische Funktionen aus, bestehen aber im Unterschied zu diesen aus nur einem Polypeptidstrang.

Die Enzyme können gelöst oder strukturgebunden (membrangebunden) vorliegen. Zu den strukturgebundenen Enzymen gehören die Enzyme der Mitochondrien und der Chloroplasten.

## 12.3 Aktives Zentrum und Coenzyme (Cofaktoren)

Entscheidend für die Katalyse durch Enzyme ist bei Protein-Enzymen deren *aktives Zentrum*. Als aktives Zentrum eines Enzyms (ebenso wie Proteohormons, Immunoglobulins, Toxins) wird der Teil des Moleküls verstanden, der unmittelbar an der biologischen Funktion beteiligt ist. Bei konjugierten (zusammengesetzten) Enzym-Proteinen [Proteiden] unterscheidet man hingegen das *Apoenzym* und die *prosthetische Gruppe*, auch *Coenzym* oder *Cofaktor* genannt. Die enzymatische Aktivität wird erst durch die Verbindung von Protein mit diesen Cofaktoren, dem *Holoenzym*, entfaltet. Etwa 50 % aller Enzyme benötigen ein Coenzym für die Entwicklung ihrer Aktivität, oft ist eine reversible Spaltung der beiden möglich. Das aktive Enzym kann am Wirkungsort aus einer inaktiven Vorstufe gebildet werden. Aktivierungsvorgänge (vgl. Abb. 11-2) haben eine besondere Bedeutung bei den proteolytischen Enzymen, da dadurch z.B. eine Selbstverdauung verhindert wird.

Abb. 12-2. Aktivierung des Chymotrypsins (---- Disulfidbrücken).

So wird das im Pankreassaft enthaltene Chymotrypsin B erst im Zwölffingerdarm [Duodenum] in die aktive Form durch Spaltung der Peptidbindungen A-D (Abb. 11-2) umgewandelt. Die proteolytische Aktivität tritt bereits nach Spaltung der Bindung A auf ( $\pi$ -Chymotrypsin mit N-terminalem Isoleucinrest). Beim  $\alpha$ -Chymotrypsin sind die Bindungen A-D gespalten. Die drei Peptidketten werden durch Disulfidbrücken zusammengehalten und dadurch offensichtlich eine für die Aktivität benötigte Konformationsänderung ermöglicht. Beim Pepsin erfolgt der Aktivierungsvorgang durch die Protonen des Magensaftes (Pepsinogen  $\rightarrow$  Pepsin). Pepsin gehört zu den sauren Proteasen. Es enthält ungewöhnlich viel Aminosäuren mit Carboxylgruppen. Vier basischen Resten im Molekül stehen 36 Carboxylgruppen gegenüber.

Innerhalb eines Individuums kommen Enzyme mit identischer Funktion, aber Unterschieden in ihrer Sequenz vor. Diese multiplen Formen eines Enzyms bezeichnet man als *Isoenzyme*. Sie stellen frühe Formen einer Proteindifferenzierung dar. Auf der anderen Seite ist aber auffallend, dass in der Nähe des aktiven Zentrums eines Enzyms strenge strukturelle Beziehungen zwischen Enzymen verschiedener Spezifität und Herkunft bestehen. Die an der Bildung des aktiven Zentrums beteiligten Aminosäuren müssen jedoch nicht unbedingt unmittelbar miteinander verbunden sein, sondern können auch durch entsprechende Faltung in der aktiven Struktur räumlich benachbart sein. Strukturelle Ähnlichkeiten am aktiven Zentrum sind besonders gut bei Hydrolasen untersucht worden.

Die Hydrolasen lassen sich nach ihrer Struktur am aktiven Zentrum in folgende vier Gruppen einteilen:

1. Hydrolasen mit einem aktiven Serinrest: Carboxylesterasen (Acetylcholinesterase)  
Proteasen der Tiere (Chymotrypsin, Trypsin, Thrombin, Plasmin) und bestimmter Bakterien (Subtilopeptidase)
2. Hydrolasen mit einem aktiven Cysteinrest: pflanzliche Proteasen
3. Hydrolasen mit einem bivalenten Metallion: Exopeptidasen (Carboxypeptidase)
4. Proteasen mit einem Wirkungsoptimum bei sehr niedrigem pH-Werte (saure Proteasen):  
z.B. Pepsin.

Die *Serin-Hydrolasen* sind charakterisiert durch eine ungewöhnlich starke Nucleophilie der Hydroxygruppe eines Serinrestes. Im Unterschied zu anderen Serinresten reagiert diese aktive Hydroxygruppe mit aktivierten Phosphorsäureestern wie Diisopropylfluorophosphat (DFP). Durch Phosphorylierung kommt es zu einer Inaktivierung des Enzyms.

Viele Serin-Hydrolasen ähneln sich in ihrer Sequenz am aktiven Zentrum, also in unmittelbarer Nähe dieses Serinrestes (Tab. 11-2), so dass für diese Enzyme eine evolutionäre Entwicklung von einem gemeinsamen "Urenzym" angenommen wird. Bei den meisten Veränderungen handelt es sich um einen konservativen Austausch.

### Tabelle 12-1:

Ungefähr ein Drittel aller Enzyme benötigen für die Entfaltung ihrer optimalen Aktivität die Anwesenheit von Metallionen, die als Cofaktoren dienen. Als katalysierend wirkende Metalle kommen vor allem die Übergangselemente Mn, Fe, Mo, Co, Cu und Zn vor (vgl. Tab. 11-23, Metalloproteine). Innerhalb dieser metallhaltigen Enzyme werden zwei Haupttypen unterschieden, die ineinander übergehen können:

1. Die *Metalloenzyme*, bei denen das Metallion integraler Bestandteil ist, der in einem bestimmten molaren Verhältnis zum Protein vorkommt. Die Metallionen dissoziieren unter physiologischen Verhältnissen praktisch nicht. Nach ihrer Entfernung geht die enzymatische Aktivität verloren. Es handelt sich vor allem um  $\text{Fe}^{2+}$  bzw.  $\text{Fe}^{3+}$  (Oxido-reduktasen, Cytochrom, Peroxidase, Katalase),  $\text{Cu}^{2+}$  (Oxidasen, Cytochrom-Oxidase, Tyrosinase),  $\text{Zn}^{2+}$  (Dehydrogenasen, Carboxylasen, Peptidasen, Hydrolasen),  $\text{Mo}^{2+}$  (Sulfit-Oxidasen, Aldehyd-Oxidasen, Xanthin-Oxidasen, Nitrat-Reduktasen),  $\text{Mn}^{2+}$  (Pyruvat-Carboxylase, Phosphotransferasen) und  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\alpha$ -Amylase).
2. Die *Metallionen-aktivierten Enzyme*, bei denen das Metallion nur relativ locker gebunden ist und während der Isolierung des Enzyms verlorengehen kann. Die Metallionen werden für die Entwicklung der maximalen Aktivität des Enzyms benötigt. Es handelt sich vor allem um die Elemente  $\text{Zn}^{2+}$  (Acylase),  $\text{Mg}^{2+}$  (Hexokinase, Adenosin-Triphosphatase, Carboxylase),  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  (Plasmamembran-ATPase) und  $\text{K}^+$  (Pyruvat-Kinase).

## 12.4 Spezifität, Kinetik und Mechanismus der Enzymkatalyse

### 12.4.1 Wirkungs- und Substratspezifität

Praktisch sind alle biologischen Reaktionen durch Enzyme katalysiert. Bei der Spezifität von Enzymen unterscheidet man die Wirkungsspezifität, d.i. die Fähigkeit, von verschiedenen Möglichkeiten der chemischen Umsetzungen eine ganz bestimmte auszuwählen, und die *Substratspezifität*. Die Wirkungsspezifität reflektiert sich in der Klassifizierung der Enzyme, z.B. bei den Hydrolasen die Gruppe der Esterasen (Spaltung und Bildung von Estern), die Carboxylasen (decarboxylieren Carbonsäuren), die Peptidasen (Hydrolyse von Peptidbindungen), bei den Desmolasen (veraltete Bezeichnung für Enzyme, die die Bindung zwischen zwei Kohlenstoff-Atomen spalten) die Oxidasen (Übertragung von  $\text{O}_2$ ), die Peroxidasen (Übertragung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und die Hydratasen (Addition von  $\text{H}_2\text{O}$ ). Enzyme zeichnen sich meist durch hohe Substratspezifität aus (E. FISCHER, 1894, Schlüssel-Schloss-Prinzip). Als Beispiel für die Substratspezifität sei hier die Maltase angegeben, die nur das Disaccharid Maltose, Malzzucker (vgl. 5.3), zu Glucose spaltet, nicht aber die diastereomere Cellobiose und andere Disaccharide. Acylase I aus Schweinenieren z.B. spaltet nur die L-Form acetylierter Aminosäuren.

Verantwortlich für die Wirkungsspezifität ist das Coenzym, bei reinen Enzym-Proteinen das aktive Zentrum. Innerhalb des aktiven Zentrums des Enzyms werden der bindende Teil [*binding site*] und der eigentlich

katalysierend wirkende aktive Teil [*active site*] unterschieden. Beide Bezirke können jedoch auch zusammenfallen. Das Protein besitzt meist einige Zentren, an denen eine Adsorption möglich ist. Die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins bewirken die Substratspezifität. Beim Erwärmen auf 50 - 60 °C verlieren Enzyme durch Denaturierung daher meist ihre biologische Wirksamkeit. Verdauungsfermente könnten z.B. auch die Eiweißstoffe der Darmwand angreifen, diese sind jedoch durch die Tertiärstruktur geschützt. So ist z.B. gekochtes Fleisch leichter verdaulich, weil die Tertiärstruktur zerstört ist.

#### 12.4.2 Enzymkinetik

Durch eine Katalyse wird die freie Aktivierungsenergie einer Reaktion gegenüber der nicht-katalysierten Reaktion erniedrigt. Bei der Umwandlung eines Substrats (*S*) in ein Produkt (*P*) in Gegenwart des Enzyms (*E*) können im allgemeinen folgende Teilschritte unterschieden werden:



1. Die Bindung des Substrates an das Enzym unter Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes,
2. den eigentlichen katalytischen Prozess, der in die Aktivierung dieses Komplexes durch Umlagerung seiner Struktur und die Umwandlung des Substrates in das Produkt unterteilt werden kann, und
3. die Dissoziation des Enzym-Produkt-Komplexes unter Regenerierung des biologischen Katalysators.

Die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion wird in der Regel durch die Konformationsänderung des Proteins und die Freisetzung des Produktes begrenzt.

#### 12.3.4 Wirkmechanismen der Enzymkatalyse

Bezüglich des Mechanismus der enzymatischen Katalyse können zwei Typen unterschieden werden:

1. Eine Katalyse durch Modifizierung der Reaktanden [Katalyse durch Säuren oder Basen] und
  2. eine Katalyse durch Eingehen eines anderen Reaktionsweges [alternative pathway catalysis; nucleophile Katalyse].
3. Bei beiden Typen kann das Substrat bzw. das Produkt sowohl kovalent als auch nicht-kovalent an das Enzym gebunden werden. Einige gut untersuchte Beispiele sollen im folgenden vorgestellt werden, wobei darauf hingewiesen sei, dass auf Reaktionen, an denen Coenzyme beteiligt sind, in Kap. 6 näher eingegangen wird.

Die Wirkung des *Lysozims* [auch Muramidase oder N-Acetylmuramylglycanohydrolase] kann auf die säurekatalysierte Spaltung einer glykosidischen Bindung zurückgeführt werden. Lysozym ist das erste Enzym, das in seiner Tertiärstruktur aufgeklärt werden konnte [PHILIP, NORTH, BLAKE und Mitarb., 1967]. Es ist eine Glykosidase, die in den meisten Körpersekreten (Tränen, Nasenschleim), im Hühnereiweiß sowie in vielen tierischen und pflanzlichen Materialien vorkommt. Durch Lysozym werden spezifisch bestimmte

PoOlysaaccharide der Bakterienzellwand gespalten. Die Spaltung erfolgt zwischen *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylmuramsäure.

Abb. 12-5. Vorstellungen zum Wirkmechanismus am aktiven Zentrum des Lysozyms, an dem die Aminosäuren Glu<sup>35</sup> und Asp<sup>52</sup> beteiligt sind.

Die Glykosidbindung wird durch einen Angriff des Protons der Carboxylgruppe von Glu<sup>35</sup> am glykosidischen Sauerstoffatom geschwächt. Die Spaltung wird noch dadurch unterstützt, dass der Tetrahydropyranrest infolge der Bindung des Substrates an das Enzym in eine Halbsesselkonformation gedrängt wird. Aus dem Oxoniumsalz bildet sich durch Abspalten des *N*-Acetylglucosaminrestes ein Carbeniumion, das durch den geladenen Asp<sup>52</sup>-Rest stabilisiert wird.

Der Mechanismus der Serin-Hydrolasen soll am Beispiel des Chymotrypsins (Abb. 12- ) beleuchtet werden.

Abb. 12- . Wahrscheinlicher Wirkmechanismus am aktiven Zentrum des Chymotrypsins

Neben dem Ser<sup>195</sup> sind an der katalytischen Hydrolyse noch die Reste His<sup>57</sup> und Asp<sup>102</sup> beteiligt. Die Spaltung des Substrates (Amid) erfolgt durch einen nucleophilen Angriff der Hydroxygruppe des Serinrestes unter Bildung eines Serinesters als Intermediat. Solche Acyl-Enzyme konnten bei tiefen Temperaturen (zwischen -20 und -70 °C) röntgenographisch erfasst werden. Die besondere Reaktivität der Hydroxygruppe des Serinrestes wird durch den Einfluss der negativen Ladung des Carboxylats von Asp<sup>102</sup>, die über den Imidazolrest des His<sup>57</sup> übertragen wird, erklärt. Die Deacylierung des Serinesters erfolgt säurekatalysiert durch den Asp<sup>102</sup>-His<sup>57</sup>-Komplex (Abb. 11-7).

Abb. 12-7. Wahrscheinlicher Wirkmechanismus am aktiven Zentrum des Chymotrypsins.

## 12.5 Coenzyme und ihre Reaktionen

### 12.5.1 Coenzyme zur Wasserstoffübertragung

Wichtigste Cofermente für H<sub>2</sub>-Übertragungen in biologischen Redoxsystemen wie der pflanzlichen Photosynthese sind *Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid* NAD<sup>+</sup> und das entsprechende 2"-Phosphat *Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat* NADP<sup>+</sup>. NAD<sup>+</sup> ist Bestandteil von Oxidoreduktasen, z.B. wird in Verbindung mit dem Enzym *Alkohol-Dehydrogenase* [ADH] Ethanol unter Bildung des reduzierten Coenzym NADH zu Acetaldehyd oxidiert.

An der Wasserstoffübertragung ist ausschließlich der Pyridinring beteiligt, dennoch ist auch der Adeninrest für

die enzymatische Aktivität erforderlich. Durch die positive Ladung ist der Pyridiniumring besonders leicht durch Nucleophile (z.B. Hydridionen  $H^-$ ) angreifbar, und daraus resultiert auch das relativ niedrige Redox-Potential von  $E_0 = 0,32 \text{ V}$  des Redoxgleichgewichts zwischen Pyridinium- und Dihydropyridin-Verbindung. Ungeladenes Nicotinamid selbst ist schwer hydrierbar ( $E_0 = 1.57 \text{ V}$ ).

Ähnlich wie  $NAD^+$  wirkt das Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat  $NADP^+$ .

Die Hydridübertragung bei den Oxidoreduktasen erfolgt stereospezifisch und ohne Beteiligung des umgebenden Mediums. Die Dehydrierung verläuft unter Aromatisierung, während bei der Reduktion des Pyrimidiniumringes das C-4-Atom  $sp^3$  hybridisiert und damit tetragonal wird. Bei selektiv deuteriertem  $CH_3\text{-CDH-OH}$  als Substrat wird je nach Isomerem nur Deuterium D oder nur Wasserstoff H entfernt. Da sich das Substrat dem planaren Pyridinring jeweils nur von einer Seite nähert, entsteht bei der Oxidation eines deuterierten Substrates  $SD_2$  ein neues Chiralitätszentrum am C-4 des Dihydropyridinringes.

*Flavin-Adenin-Dinucleotid FAD* ist ein wichtiges Coenzym, das ebenso als Wasserstoffüberträger und Elektronenakzeptor bei Dehydrierungsreaktionen fungiert.

*Riboflavin [Laktoflavin, Vitamin B<sub>2</sub>]* bildet als Phosphat ein  $H_2$ -übertragendes Enzym, das sogenannte gelbe Ferment, Flavinmononucleotid FMN. Riboflavin bzw. Flavin-nucleotid sind für den Menschen ein wichtiger Nahrungsstoff, man findet sie vor allem in tierischen Innereien, Eiern, Milch, Hefe, in grünem Gemüse und gekeimtem Samen.

Riboflavin wird neben mikrobiologischen Verfahren meist aus 3,4-Dimethylanilin synthetisiert.

### **12.5.3 Coenzyme als Elektronenüberträger**

Ubichinon, 1953 unabhängig voneinander durch MORTON und GREEN entdeckt, ist ein Coenzym, das in allen biologischen Systemen (ubiquitär) vorkommt. Es ist ein Chinoderivat mit einer langen Isoprenoidkette, wobei die Anzahl der Isopren-Einheiten speziesabhängig ist, die in Säugern häufigste Form besitzt 10 Isopreneinheiten und wird als Coenzym Q10 bezeichnet. Q9 wurde in Fischen gefunden, Q11 und Q12 in Ratten. In niederen Pilzen findet sich U50 (50 C-Atome in 10 Isoprenoideinheiten in der Seitenkette) mit terminaler gesättigter Isoprenoideinheit. Ubichinon ist eines der Coenzyme der Atmungskette in den Mitochondrien. Es übernimmt Elektronen sowohl vom NADH-Reduktase-Komplex als auch vom  $FADH_2$  und leitet sie weiter an die Cytochrome.

### **12.5.1 Coenzyme zur Gruppenübertragung**

*Coenzym A* [CoA, CoA-SH] spielt als Acylgruppen- und insbesondere als Acetylgruppen-übertragendes Coferment sowohl im Fett- als auch im Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsel eine bedeutende Rolle. Acetylierung der SH-Gruppe des Cysteaminanteils bildet das energiereiche *Acetyl-Coenzym A* [*Acetyl-CoA*], das als Thioester den Acetylrest leicht überträgt. Die Veresterung des Cysteamins, zu der Energie erforderlich ist, erfolgt durch Phosphorylierung durch Adenosintriphosphat [ATP] über ein gemischtes, reaktives Anhydrid.

Enzymatische Decarboxylierungen wie z.B. die der Brenztraubensäure werden durch *Carboxylase* [*Carboxybiotin*] oder Cocarboxylase bewirkt. Dabei wirkt das Pyrophosphat [Thiaminpyrophosphat] des Vitamin B<sub>1</sub> [Thiamin] als Coenzym. Thiamin ist ein essentieller Nahrungsfaktor für den Menschen. Der wichtige Schritt ist die Isomerisierung der 2-Position des Thiazoliumringes, der zur Aufnahme der Brenztraubensäure dient. Nach der CO<sub>2</sub>-Abspaltung wird der Rest als "aktiver Acetaldehyd" auf Liponsäureamid übertragen.

*Formel 11-2.* Decarboxylierung von Brenztraubensäure zu Acetyldehyd

*Pyridoxalphosphat* [PLP] ist eine prosthetische Gruppe, die als Wirkgruppe bei Aminotransferasen, Decarboxylasen, Racemasen, Lyasen und Synthetasen auftritt.

Mit Aminosäuren entstehen SCHIFF'sche Basen. Die Funktion besteht im allgemeinen dadurch, dass Amine reaktive Imine bilden, aus denen Protonen oder andere benachbarte Gruppen eliminiert bzw. in denen sie substituiert werden können. Wahrscheinlich treten stabilisierte Carbanionen als Zwischenprodukte auf.

*Tetrahydrofolsäure* [*N*-[(6S)-5,6,7,8-Tetrahydropteroyl]-L-glutaminsäure] übt im Organismus die Funktion eines C<sub>1</sub>-Überträgers aus und wird als *Coenzym F* bezeichnet. Je nach Art und Position der gebundenen C<sub>1</sub>-Einheit unterscheidet man 5-Methyl-tetrahydrofolsäure, 5,10-Methylen-tetrahydrofolsäure ("aktivierter Formaldehyd"), 10-Formyl-tetrahydrofolsäure ("aktivierte Ameisensäure") und 5-Formyl-tetrahydrofolsäure.

Methylierungen gehen über Coenzym B<sub>12</sub> und S-Adenosyl-methionin

## 12.6 Beispiele einzelner Enzyme

Die *Cytochrome* sind Katalysatoren der Zellatmung [Oxidoreduktasen], die ein Häm oder Häm-Derivat als prosthetische Gruppe enthalten, über 30 Cytochrome sind bekannt. *Cytochromoxidase* [*Cytochrom c-Oxidase*], das frühere WARBURG'sche Atmungsferment, ist ein Lipid-haltiges Enzym der inneren Mitochondrien-Membran. Rinderherz-Cytochromoxidase ist ein aus 13 Polypeptidketten bestehender Komplex, von dem die

drei größten Untereinheiten MG 57.000, 26.000 und 30.000 besitzen. Es enthält im Molekül 2 Eisenatome und 2 Kupferatome.

*Nitratreduktasen* sind in Pflanzen, Hefen, Pilzen und Bakterien weit verbreitet; sie katalysieren die Einelektronenreduktion von Nitrat zu Nitrit entweder bei der Gewinnung freier Energie in der Atmungskette oder bei der Stickstoffassimilation.

*Phospholipase A<sub>2</sub>* wird vom Pankreas als ein Proenzym sekretiert, welches erst durch enzymatische Abspaltung eines *N*-terminalen Heptapeptidterminus zu Phospholipase A<sub>2</sub> aktiviert wird. Phospholipase aus Schwein besteht aus 124 Aminosäureeinheiten, die Struktur ist gefaltet und wird durch 7 Disulfidbrücken stabilisiert.

*Ribonuklease* ist ein weiteres Pankreasenzym, Rinderribonuklease besteht ebenso aus 124 Aminosäureeinheiten, die Struktur wird durch vier überkreuzte Disulfidbrücken gefestigt. Enzymatische Spaltung von Ribonuklease mit dem Enzym Subtilisin führt durch Hydrolyse der Bindung Ala<sup>20</sup>-Ser<sup>21</sup> zu einem "S-Peptid" mit 20 Aminosäuren und einem "S-Protein" mit 104 Aminosäuren.

Unter den Endopeptidasen ist Pepsin aus 306 Aminosäuren aufgebaut und spaltet Peptidbindungen, an deren Aufbau das N-Atom aromatischer Aminosäuren wie Tyrosin und Phenylalanin beteiligt sind. Für Trypsin kennzeichnend ist ein negativ geladener L-Aspartat-Rest in der Substrat-Bindungstasche, der die Spezifität des Enzyms bestimmt. Trypsin soll gegen Schlangenbisse wirksam sein.

Lysozym bricht die Zellwände von Bakterien durch Hydrolyse der  $\beta(1-4)$ -Glykosidbindung, also Spaltung von Polysacchariden. Die Substratspezifität ist beim Lysozym aufgeklärt, es besteht aus 129 Aminosäuren und vier Disulfidbrücken. Der Enzym-Substrat-Komplex ist bekannt, ebenso die Aminosäuren am aktiven Zentrum.

## 12.7 Stereochemische Bedeutung der Enzyme

Unterscheidung mit Deuterium D möglich

Optische Ausbeuten meist 100 %. Man kann damit optisch aktives NAD.DH gewinnen:

Auf dieser Basis werden die sterischen Wirkungseffekte von zahlreichen Enzymen bestimmt. Möglichkeit zur asymmetrischen Synthese, der spezifischen Umwandlung, der totalen kinetischen Racematspaltung durch Auf- oder Abbau. Auch die folgenden „optisch aktiven“ chiralen Verbindungen konnten erhalten werden und die Chiralität bewiesen werden.

Bezeichnungen für solche Umwandlungen bei der as-Synthese

prochirales System  $\Rightarrow$  chirales System

Ebene Anordnung  $sp^2$ -Konfiguration

Das Konzept der Prochiralität fordert eine eigene Nomenklatur

Für die beiden Seiten einer Ebene ( $sp^2$ -) nun auch zwei enantiotope Seiten, bei Anwesenheit eines asymmetrischen Zentrums zwei diastereotope Seiten.

Sequenzregel nach Kahn-Ingold

Enantiotope H-Atome, austauschbares H-Atom durch eine andere Gruppe  $\Rightarrow$  Enantiomere

*Pro-R* und *pro-S*: man denkt sich das fragliche H-Atom durch ein schwereres Isotop ersetzt.

## 12.8 Enzyme im Labor und Technik

### 12.7.1 Enzyme - Werkzeuge in der analytischen Chemie - in der asymmetrischen Synthese - Enzyme in der Technik

Die enzymatische Analyse hat aufgrund der hohen Spezifitäten von Enzymreaktionen in den vergangenen Jahren Einzug in die Routineanalytik gehalten. Voraussetzung ist die Verfügbarkeit reiner Enzyme aus tierischem oder pflanzlichem Material. Vor allem in der Lebensmittelanalytik finden eine Reihe von enzymatischen Methoden Anwendung, z.B. die enzymatische Bestimmung von Kohlenhydraten in Lebensmitteln und Getränken, die Bestimmung von Milchsäure in Molkereiprodukten, von Säuren wie Citronensäure, Isocitronensäure und L-Äpfelsäure, von Aminosäuren und Cholesterin. Enzymatische Reaktionen erfreuen sich auch in der klinischen Diagnostik zunehmender Beliebtheit. Die Aktivitätsbestimmung von Enzymen, deren Auftreten typisch für ein erkranktes Organ ist, ermöglichen oft die Erkennung von Stoffwechselstörungen. Dazu gehören die Bestimmung von Harnsäure, Blutzucker, Blutharnstoff, Fett- und Cholesterin und Blutalkohol.

Die Hauptaufgabe der asymmetrischen Synthese besteht in der Herstellung chiraler, möglichst enantiomerenreiner Verbindungen für die Naturstoff- und Wirkstoffsynthese. Der große Lehrmeister in Sachen katalytische asymmetrische Synthese ist die Natur selbst, deren Katalysatoren, aus chiralen Aminosäuren aufgebaute Enzyme, unübertroffen im Hinblick auf Enantioselektivität, Substratspezifität und Reaktionsbeschleunigung scheinen. Das Gebiet der asymmetrischen Synthese mit Enzymen entwickelt sich zur Zeit rasch und hat vor allem mit der Entwicklung von Enzymen, die auch in organischen Lösungsmitteln angewendet werden können, ein vielversprechendes Stadium

Mit Hilfe von Biokatalysatoren lassen sich eine Palette wichtiger C—C-Verknüpfungen in überzeugender Weise stereoselektiv durchführen. Unter den Aldolasen am häufigsten verwendet ist die Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase [FDP-Aldolase] aus Kaninchenmuskel. Bei den meisten in präparativem Maßstab durchgeführten Aldolreaktionen erweist sich das Enzym als praktisch vollkommen stereospezifisch.

*Formel 12-3. Enzymatische Aldolreaktion mit FDP-Aldolase als Biokatalysator*

Durch Fermentation geeigneter Substrate mit Bäckerhefe [*Saccharomyces cerevisiae*] gelangen unterschiedliche C—C-Verknüpfungen. Häufig untersucht wurden durch Hefe vermittelte Acyloinkondensationen von Aldehyden mit Acetaldehyd, katalysiert durch die Pyruvat-Decarboxylase in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen und Thiaminpyrophosphat.

Pyruvat-Decarboxylase [PDC] spielt eine wichtige Rolle im Stoffwechsel verschiedener Hefen und pflanzlicher Samen. Das Enzym katalysiert die Decarboxylierung von 2-Oxosäuren zu den entsprechenden Aldehyden im Verlauf der alkoholischen Gärung.

Mit der kommerziell zugänglichen Mandelonitril-Lyase [MNL] aus Bittermandeln [*Prunus amygdalus*], die Flavinadeninucleotid FAD enthält, können durch Addition von Blausäure an aliphatische und aromatische Aldehyde (*R*)-Cyanhydrine im Kilogramm-Maßstab hergestellt werden.

*Formel 11-4. Asymmetrische Synthese von (R)-Cyanhydrinen mit Mandelonitril-Lyase*

Oxidoreduktasen werden erfolgreich zur asymmetrischen Reduktion und reduktiven Aminierung von Ketonen und zur Hydrierung von Alkenen eingesetzt. Die Lactat-Dehydrogenase [L-LacDH] katalysiert die enantioselektive Reduktion von  $\alpha$ -Ketosäuren. Bereits vor 85 Jahren [1918] wurde erstmals von einer stereoselektiven Reduktion einer Carbonylverbindung durch gärende Bäckerhefe berichtet.

Die Alkoholdehydrogenase [TBADH] aus dem thermophilen Bakterium *Thermoanaerobicum brockii* sowie die Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase [HLADH] reduziert kleine aliphatische Ketone mit hoher Enantioselektivität.

Esterasen, Lipasen und Proteasen wurden sehr erfolgreich zur Differenzierung enantiotoper Alkoxy-carbonyl-, Acyloxy- und Hydroxygruppen eingesetzt. Ein schon fast klassisches Enzym für die enantioselektive Hydrolyse der Dimethylester prochiraler Dicarbonsäuren und der Diacetate prochiraler Dirole in Wasser ist die Schweineleber-Esterase [PLE], eine komplexe Mischung aus mehreren Isoenzymen.

Ideale Hydrolasen für die asymmetrische Synthese sind Lipasen, die aus unterschiedlichen biologischen Quellen kommerziell zur Verfügung stehen. Mit großem Erfolg werden die Lipasen aus Schweinepankreas [PPL], *Candida cylindracea* und *Pseudomonas fluorescens* verwendet.

Eine sowohl in unpolaren als auch in polaren organischen Lösungsmitteln hinreichend aktive Protease ist Subtilisin aus *Bacillus subtilis*. Mit ihm gelingt z.B. die Racematspaltung von Aminen durch Acylierung. Eine im industriellen Maßstab betriebene enzym-katalysierte Racematspaltung ist die von *N*-Acylaminosäuren mit Acylasen. Diese Enzyme sind *N*-Acylaminosäure-Amidohydrolasen, die mit hoher Enantioselektivität racemische *N*-Acyl-D,L-aminosäuren zur L-Aminosäure und *N*-Acyl-D-aminosäure hydrolysieren.

Die Verwendung von Enzymen oder ganzen Zellen für die Herstellung oder gezielte Veränderung diverser Produkte hat sich in den letzten Jahren etabliert. Der Vorteil von Biokatalysatoren gegenüber "technischen" Katalysatoren liegt insbesondere darin, dass sie Reaktionen unter milden Bedingungen beschleunigen und die Umsetzung oft in einem einzigen Schritt erfolgt. Durch sogenannte Immobilisierungsverfahren, der Bindung des Katalysators an einen wasserunlöslichen Träger oder dessen Einschluss in eine geeignete Matrix, lässt sich auch eine leichte Abtrennung vom Reaktionsgemisch und die häufige Wiederverwendung erreichen.

In den letzten 50 Jahren wurden mehrere tausend Enzymen beschrieben, von denen viele als Eiweißstoffe biologisch unschädlich sind und ideale Voraussetzungen für einen gezielten Einsatz als Biokatalysatoren in technischen Prozessen bilden. Vorallem Mikroorganismen haben in den letzten Jahrzehnten als Quelle technischer Enzyme eine überragende Bedeutung erlangt. Zunächst wurden extrazelluläre Enzyme bevorzugt, die aus Mikroorganismen nach außen in das Medium abgegeben werden. Etwa 80 % der in der Bundesrepublik verkauften Waschmittel enthalten heute Enzyme zur Hydrolyse von Proteinverschmutzungen im Waschprozess. Die Entwicklung der Enzymtechnologie führt heute dahin, intrazelluläre Enzyme besser verfügbar zu machen und deren Produktionskosten auf ein akzeptables Maß zu senken.

## 12.9 Literatur

- A.H. ROSE (Hrsg.), *Industrial Microbiology*, Butterworths, Washington DC (1961).
- J.L. SUSSMANN et al., *Science* 253, 872 (1971).
- C. WALSH, *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Freeman & Co., San Francisco (1979).
- M.R. KULA, *Enzyme in der Technik*, *Chemie in unserer Zeit* 14, 61 (1980).
- J. TRAMPER, H.C. VAN DER PLAS und P. LINKO (Hrsg.), *Biocatalysts in Organic Synthesis*, Elsevier, Amsterdam (1985).
- A. FERSHT, *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman & Co., San Francisco (1985).
- W. HARTMEIER (Hrsg.), *Immobilisierte Biokatalysatoren*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1986).
- J. LASCH (Hrsg.), *Enzymkinetik*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg (1987).

- M. SCHNEIDER, Enzyme als Katalysatoren in der organischen Synthese, Forum Mikrobiologie 3, 65 (1987).
- K. GIERSCHNER, Enzyme in der Getreideindustrie, ZFL 1988, 41.
- H.G. DAVIES, R.H. GREEN, D.R. KELLY und S.M. ROBERTS, Biotransformations in Preparative Organic Chemistry, Academic Press, London (1989).
- H. DUGAS (Hrsg.), Bioorganic Chemistry. A Chemical Approach to Enzyme Action. 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin Heidelberg (1989).
- A. SCHELLENBERGER, Enzym-Katalyse. Eine Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme, Springer Verlag, Berlin Heidelberg (1989).
- C.H. SUELTER, Experimentelle Enzymologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1990).
- H.J. GAIS und H. HEMMERLE, Asymmetrische Synthesen mit Enzymen, Chemie in unserer Zeit 29, 239 (1990).
- C.J. SUCKLING, Enzyme Chemistry: Impact and Applications, 2. Aufl., Chapman and Hall, New York, NY (1990).
- J. LŠTHJE, Enzymkinetik, Urban & Schwarzenberg, München (1990).
- H. DIECKMANN und H. METZ, Grundlagen und Praxis der Biotechnologie - eine Einführung für Naturwissenschaftler und Ingenieure, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1991).
- H. UHLOG, Enzyme arbeiten für uns, Hanser (1991).
- P. GACESA und J. HUBBLE, Enzymtechnologie, Springer Verlag (1992).
- S.M. ROBERTS, K. WIGGINS und G. CASY, Preparative Biotransformations. Whole Cells and Isolated Enzymes in Organic Synthesis, Wiley Laboratory Publications, Wiley & Sons Ltd., UK (1992).
- S. SERVI, Microbial Reagents in Organic Syntheses, Kluwer Academic, Dordrecht (1992).
- O.P. WARD, Bioreaktionen, Prinzipien, Verfahren, Produkte, Springer Verlag (1992).
- D. SELLMANN, Angew. Chem. 105, 67 (1993).
- C.H. WONG und G.M. WHITESIDES, Enzymes in Synthetic Chemistry, Tetrahedron Organic Chemistry, Vol. 12, Pergamon (1994).
- K. FABER, Biotransformations in Organic Chemistry - A Textbook, 2. Aufl., Springer Verlag (1995).
- K. DRAUZ und H. WALDMANN, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, VCH, Weinheim (1995).
- H. DUGAS, Bioorganic Chemistry. A Chemical Approach to Enzyme Action, 3. Ed., Springer Verlag (1996).

