

Asymmetrische Synthese mit Enzymen

Vorteile:

- breite Anwendbarkeit
- milde Reaktionsbedingungen, daher kaum Racemisierungen, Epimerisierungen, Isomerisierungen und Umlagerungen als Nebenreaktionen
- hocheffektive Katalysatoren. die enzymkatalysierten Reaktionen sind bis zu 10^{12} mal schneller als die unkatalysierten Reaktionen
- hohe Stereoselektivität

Nachteile:

- hoher Preis der Enzyme
- Empfindlichkeit gegen Katalysatorgifte
- Anwendung meist in Wasser (Löslichkeitsprobleme des Substrats)
- Enzyme sind eigentlich für natürliche Substrate optimiert



Enzyme:

Enzyme sind Biokatalysatoren, die nach der klassischen Definition Umsetzungen von Substraten beschleunigen und in eine bestimmte Richtung lenken ohne im Endprodukt der Reaktionen zu erscheinen. Dabei genügen kleinste Mengen um unbestimmt große Mengen an Edukt umzusetzen.

Struktur der Enzyme:

- Polymere aus Aminosäuren (= Polypeptide, Proteine)
- die dreidimensionale Faltung wird von der Sequenz der Aminosäuren bestimmt
- Enzyme besitzen zumindest ein katalytisches Zentrum (= Substratbindungsstelle)

Coenzyme:

Manche Enzyme benötigen Coenzyme um katalytisch aktiv werden zu können.

Coenzyme sind häufig sehr teure niedermolekulare Verbindungen, sodaß ihre Verfügbarkeit einen wichtigen Faktor für die Entwicklung eines Prozesses mit isolierten Enzymen darstellt.

Die Regeneration des Coenzym erfordert meist ein weiteres Enzym.



Coenzyme (Beispiele):

Nicotinamid Adenin- Dinukleotid (NAD)	Hydridionen
Nicotinamid Adenin- Dinukleotid-Phosphat (NADP)	Hydridionen
Flavin-Mononukleotid (FMN)	Wasserstoff, Elektronen
Flavin-Adenin- Dinukleotid (FAD)	Wasserstoff, Elektronen
Coenzym Q	Wasserstoff, Elektronen
Coenzym A	Acylgruppen
Tetrahydrofolsäure	Formaldehyd
Coccarboxylase	Acetanhydrid
Pyridoxalphosphat	Aminogruppen



Ribozyme:

Katalytisch wirksame Ribonukleinsäuren bezeichnet man in Anlehnung an Enzyme als Ribozyme.

Offensichtlich bilden Ribonukleinsäuren analog zu der Tertiärstruktur von Proteinen dreidimensional geordnete Strukturen aus, wobei bestimmte Basensequenzen für eine spezifische Bindung von Substraten verantwortlich sind.

Biologische Relevanz besitzen die Ribozyme als sogenannte "Genschere", da sie definierte Abschnitte der DNA ohne Beteiligung von Enzymen ausschneiden können.

Eine Untersuchung des Mechanismus zeigte, daß es sich beim Reaktionsmechanismus um eine Reihe von Umesterungen handelt.

Katalysegeschwindigkeit:

Die Katalysegeschwindigkeit eines Prozesses wird durch die Enzymkonzentration und die Enzymaktivität bestimmt.

Die Enzymaktivität kann durch niedermolekulare Effektoren reguliert werden.

Eine Enzymhemmung kann kompetitiv oder nicht kompetitiv erfolgen und nach Entfernung des Hemmstoffes reversibel oder irreversibel sein.

Eine Enzymaktivierung ist nur über nicht kompetitive Mechanismen denkbar.



kompetitive Regulation:

Bei der kompetitiven Regulation konkurrieren verschiedene, strukturell ähnliche Substanzen um die Bindung an das katalytische Zentrum.

Bezogen auf die Umsetzung des gewünschten Substrats resultiert eine Katalysehemmung.

Grundsätzlich kann aber durch eine Erhöhung der Substratkonzentration eine kompetitive Hemmung vollständig kompensiert werden.

nicht kompetitive Regulation:

Bei der nicht kompetitiven Regulation sind Substrat und Effektor gleichzeitig am Enzym gebunden, aber an verschiedenen Bindungszentren.

Liegen die Substratbindungsstelle und die Bindungsstelle eines Enzyminhibitors in unmittelbarer Nachbarschaft kann eine Hemmung der Substratbindung direkt durch die Raumerfüllung des Inhibitors ausgelöst werden.

Ist die Substratbindungsstelle von der Effektorbindungsstelle weit entfernt, erfolgt durch die Bindung des Effektors an das Enzym eine Konformationsänderung, welche die Faltung der Proteinkette verändert, sodaß auch eine räumlich weit entfernte Substratbindungsstelle beeinflusst wird; sowohl eine Inhibition als auch eine Aktivierung der Katalyseaktivität des Enzyms kann resultieren (= allosterische Enzymregulation)



Gewinnung der Enzyme:

Enzyme können durch die Anwendung der verschiedenen Techniken der Proteinreinigung gewonnen werden.

Dabei ist darauf zu achten, daß die während der gewählten Reinigungsschritte die katalytische Aktivität der Enzyme erhalten bleibt.

Nicht alle Methoden der Enzymreinigung sind geeignet, aktives Enzym in guten Ausbeuten und mit vertretbarem Aufwand zu gewinnen.

Meist genügt für ein enzymatisches Produktionsverfahren eine enzymangereicherte Proteinfraction oder ein teilgereinigtes Enzym.

Hochgereinigte Enzyme sind mit den klassischen Methoden der Enzymreinigung kaum im technischen Maßstab ökonomisch herstellbar.

Dies ist mittlerweile jedoch durch den Einsatz gentechnischer Verfahren möglich.



Enzymnomenklatur:

Abhängig von Reaktionstyp werden die Enzyme in sechs Klassen eingeteilt:

Klasse 1: Oxidoreduktasen

Das Substrat, das oxidiert wird fungiert als Wasserstoffdonor. Oxidoreduktasen benötigen in der Regel Coenzyme um katalytisch aktiv werden zu können.

Klasse 2: Transferasen

Transferasen übertragen eine Gruppe (z.B. Methyl-, Acyl- oder Glycosylreste) von einem Donor auf einen Acceptor. Häufig ist der Donor ein Coenzym.

Klasse 3: Hydrolasen

Hydrolasen spalten C-C, C-O oder C-N Bindungen durch Hydrolyse

- Esterhydrolasen (= Esterasen)
- Peptidhydrolasen (= Peptidasen)
- Glycosidhydrolasen (= Glycosidasen)

Obwohl die Hauptfunktion dieser Enzyme die Hydrolyse ist, katalysieren viel Hydrolasen unter geeigneten Bedingungen auch den Gruppentransfer.



Klasse 4: Lyasen

Lyasen spalten C-C, C-O oder C-N Bindungen unter Eliminierung einer Gruppe

- (De)carboxylasen: spaltet aus Carbonsäuren CO_2 ab
- Aminosäure-Ammoniak-Lyase: nicht oxidative Desaminierung von Aminosäuren
es entsteht Ammoniak und eine ungesättigte Carbonsäure
- Katalase: spaltet Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff

Klasse 5: Isomerasen

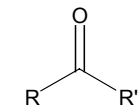
Isomerasen bewirken intramolekulare Umlagerungen und je nach Typ der Umlagerung als Mutasen, Epimerasen, Isomerasen oder Racemasen bezeichnet

Klasse 6: Ligase

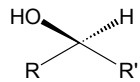
Ligasen verknüpfen zwei Moleküle miteinander, wobei gleichzeitig eine energiereiche Phosphatbindung (z.B. aus ATP) hydrolysiert wird.


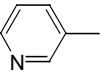
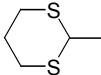
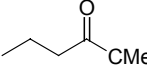


Enantioselektive Reduktion:



Alkoholdehydrogenase



R	R'
CH ₂ COOEt	CH ₃
	CH ₂ COOH
Aryl	CF ₃
	CH ₃
	
Me	CH ₂ OH
Et	CH ₂ OH

Cofaktoren werden in äquimolaren Mengen gebraucht

Für teure Cofaktoren sind billige recycling-Systeme nötig !

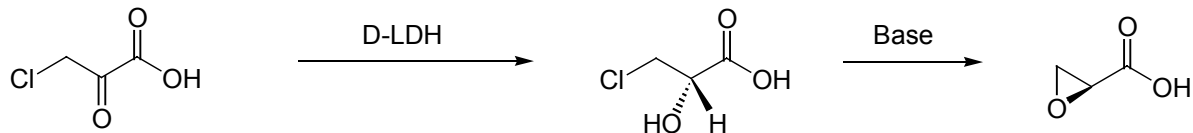
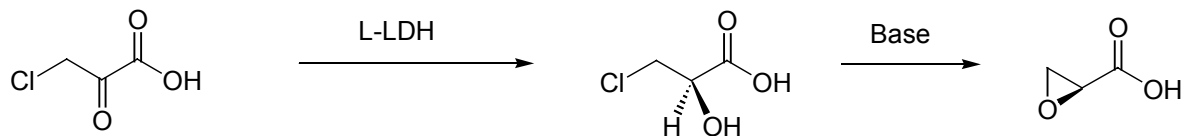
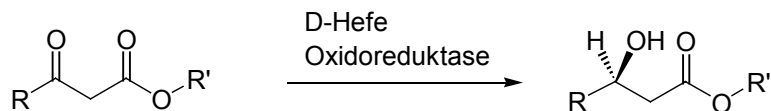
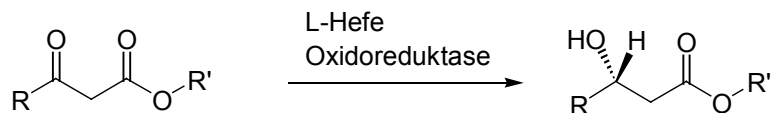
Ausweg:

Reduktion mit Mikroorganismen (z.B. Hefe)

Regeneration des Coenzym erfolgt durch den Stoffwechsel des Mikroorganismus



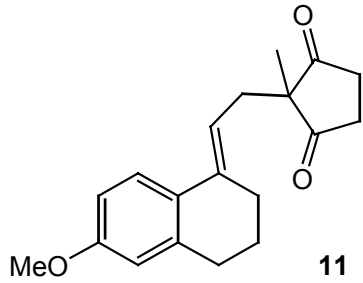
Enzyme mit inverser Stereoselektivität:



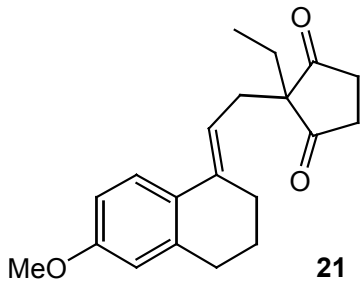
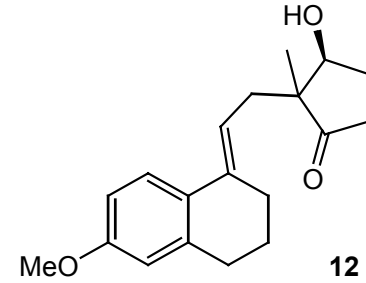
aber: Sterische Ansprüche der „enantiotopen Enzyme“ nicht gleich



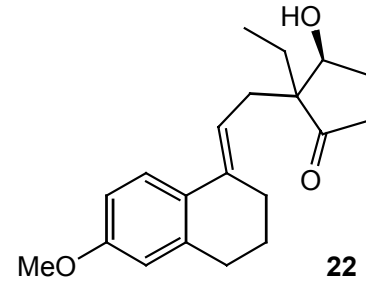
Stereoselektive Synthese von Steroiden:

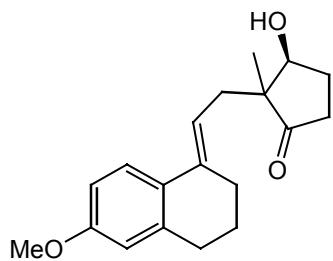


*Saccharomyces
uvarium*

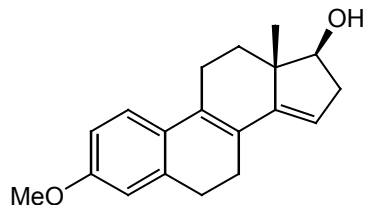


*Saccharomyces
uvarium*

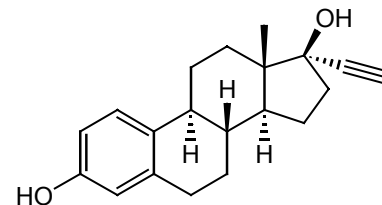




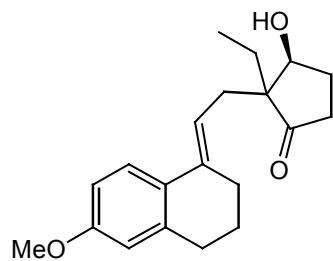
12



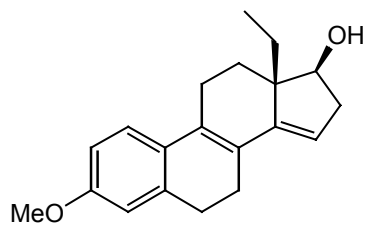
13



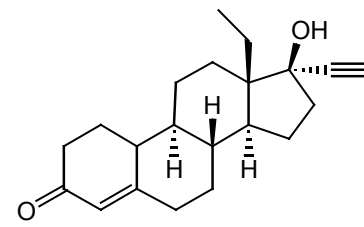
Ethinylestranol (**14**)



22



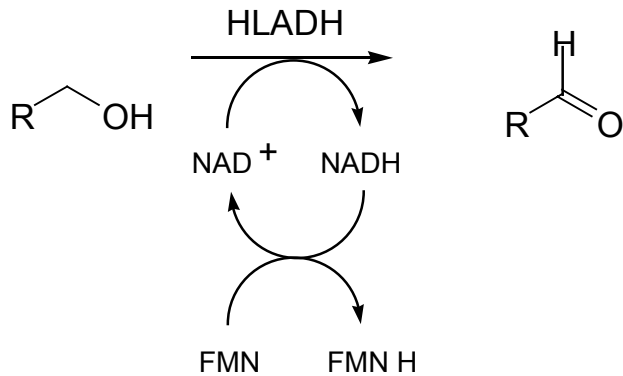
23



Levorgestrel (**24**)

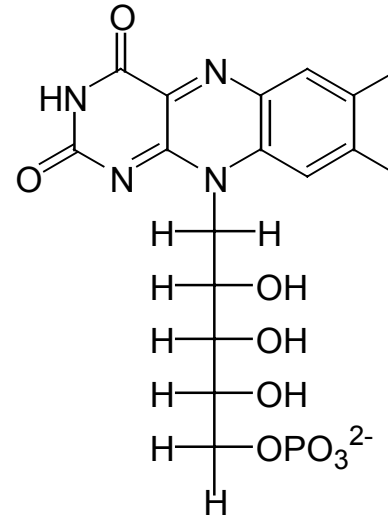


Enantioselektive Oxidation:



NAD^+ : 5g 350€

FMN: 100g 100€



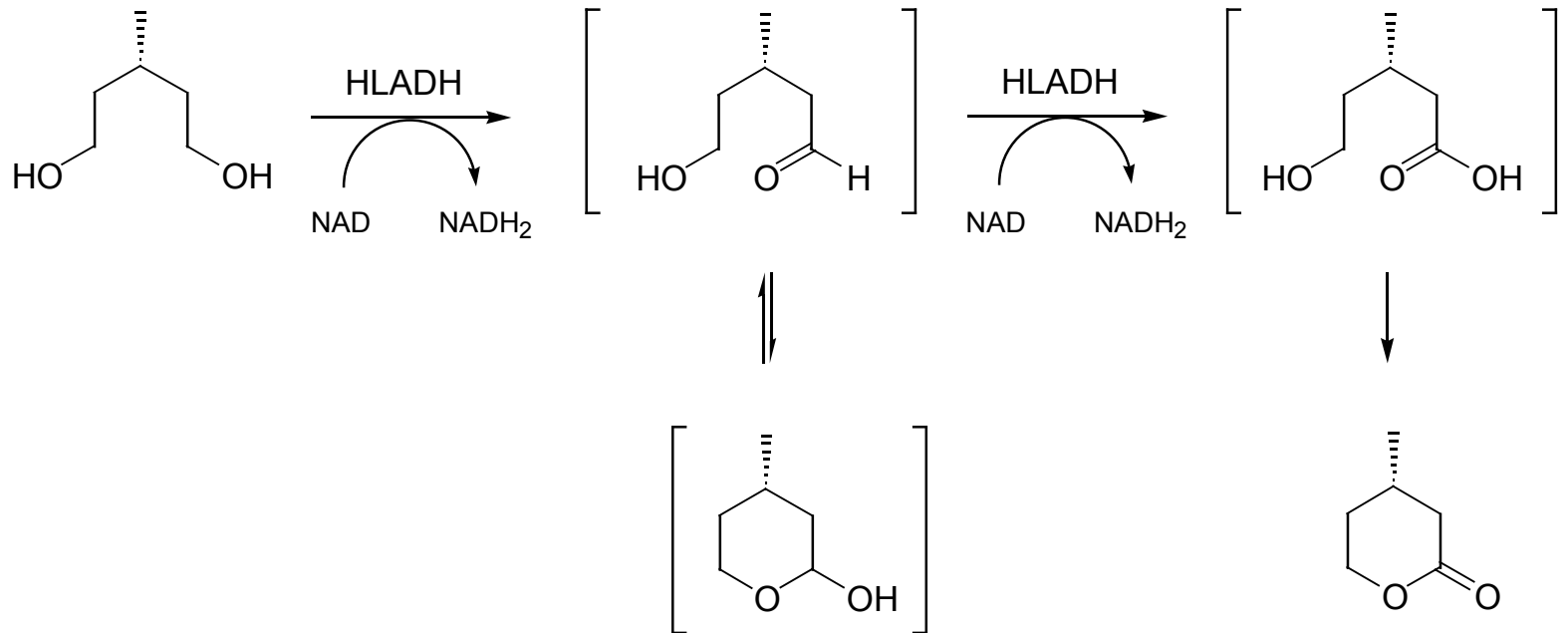
FMN

Cofaktoren werden in äquimolaren Mengen gebraucht

Für teure Cofaktoren sind billige recycling-Systeme nötig !



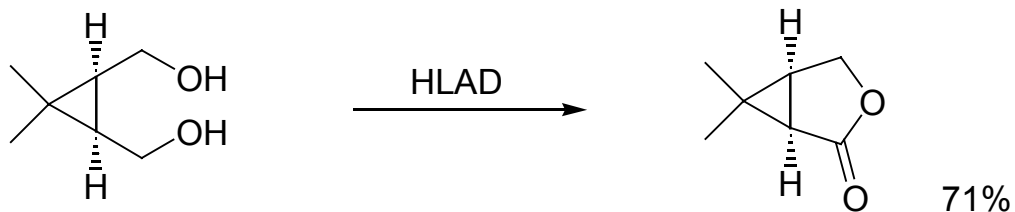
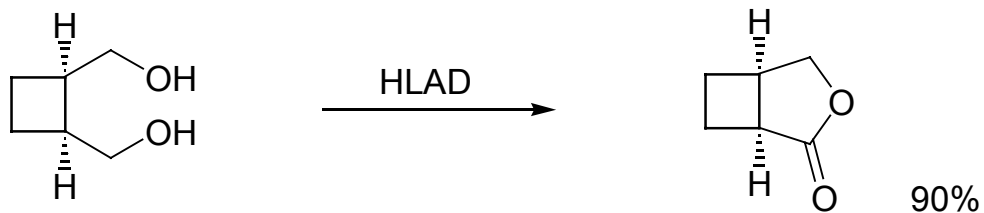
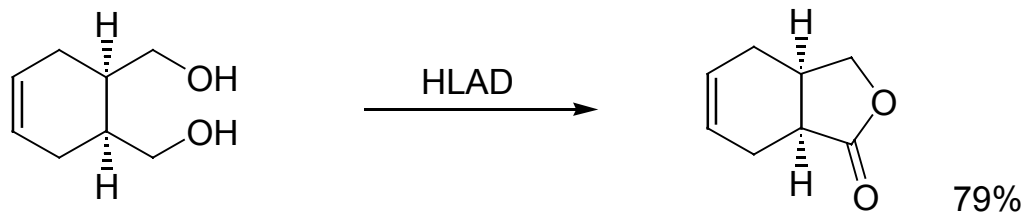
Synthese von Lactonen aus meso-Glycolen (1):



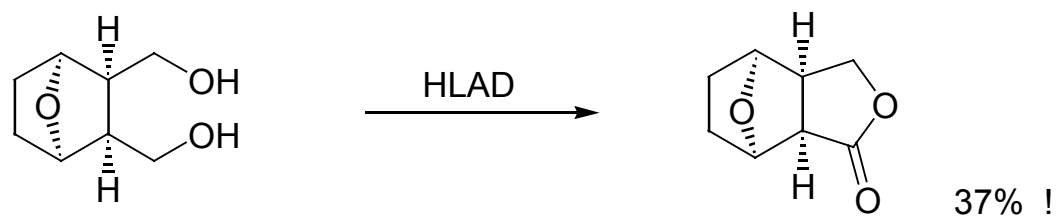
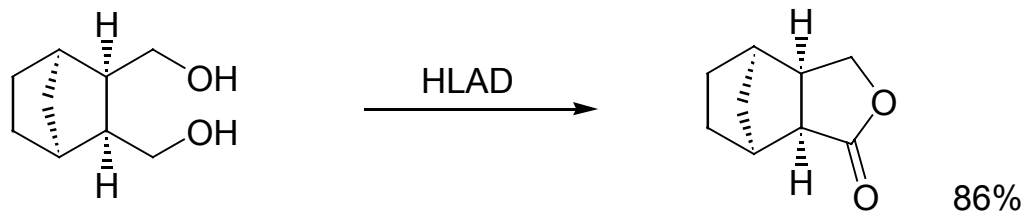
Enantiotope Diskriminierung (= meso-Trick)



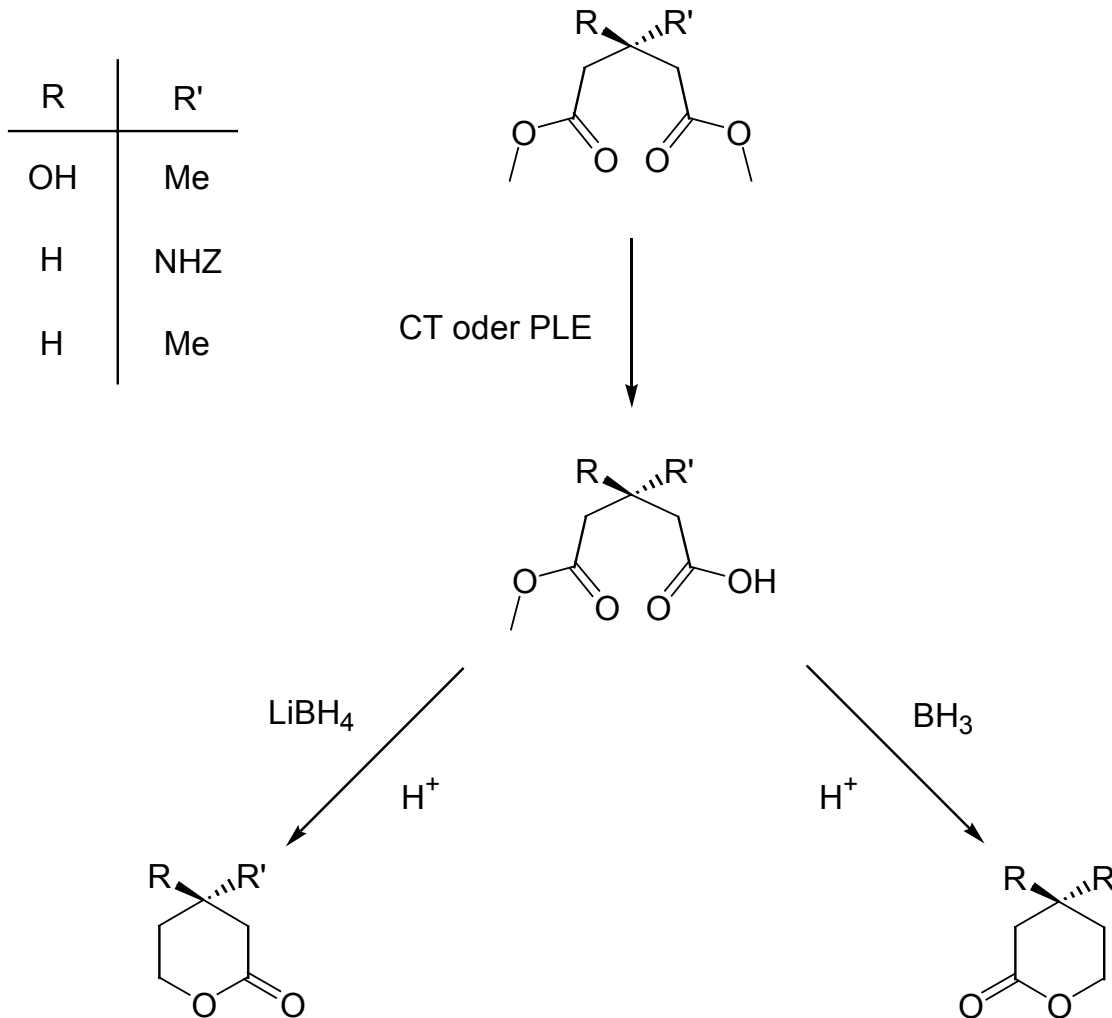
Synthese von Lactonen aus meso-Glycolen (2):



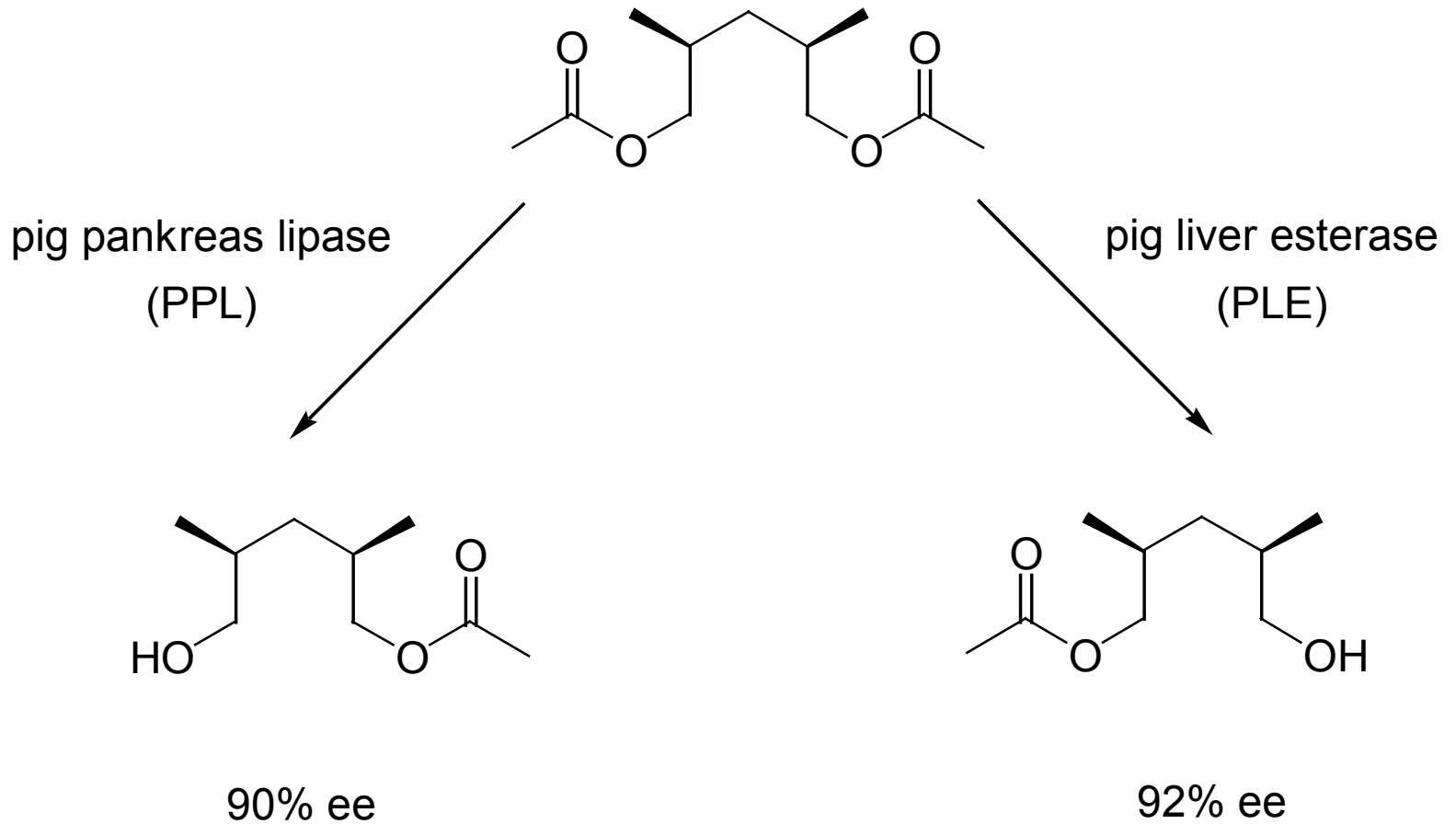
Synthese von Lactonen aus meso-Glycolen (3):



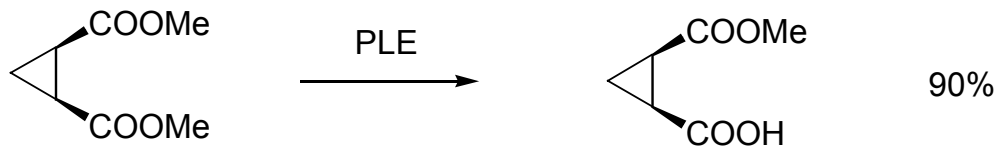
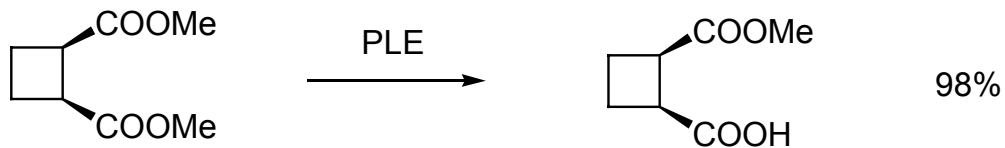
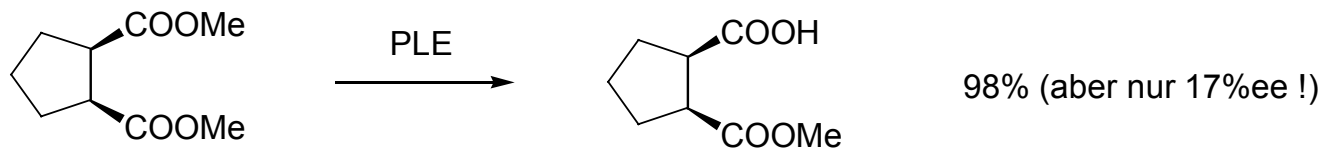
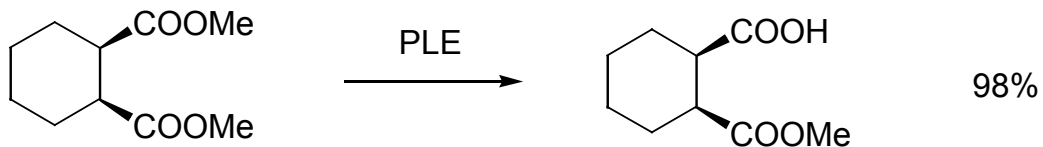
Enantioselective Hydrolyse:



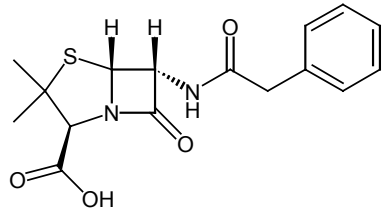
Enzyme mit inverser Stereoselektivität:



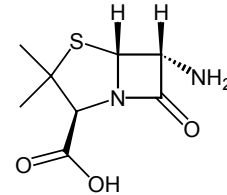
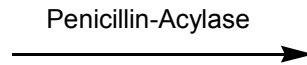
Enantioselective Hydrolyse: meso-Trick



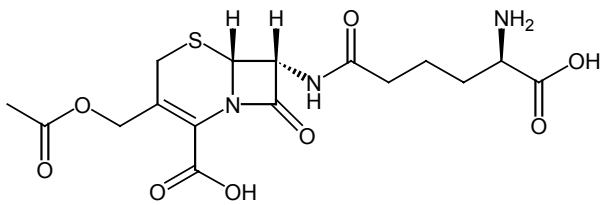
Regioselektive Hydrolyse:



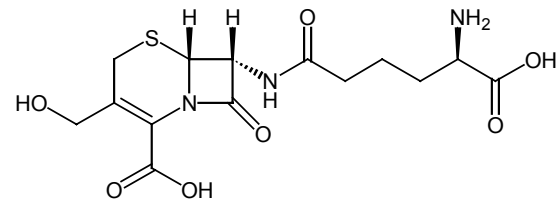
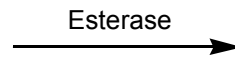
Penicillin G



6-Amino-penicillinansäure

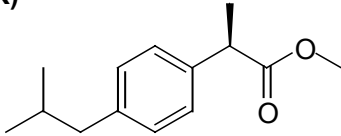


Cefalosporin C

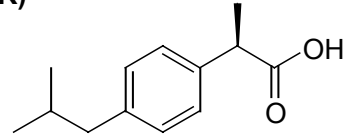


Enzymatische Racematspaltung (1):

(R)-



(R)-



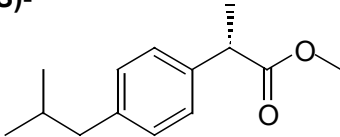
Abtrennbar durch Extraktion

Pferdeleberesterase
H₂O / pH=7,2 / 20 °C



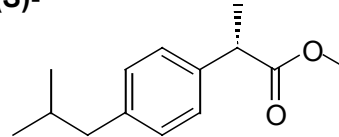
+

(S)-



Ibuprofen

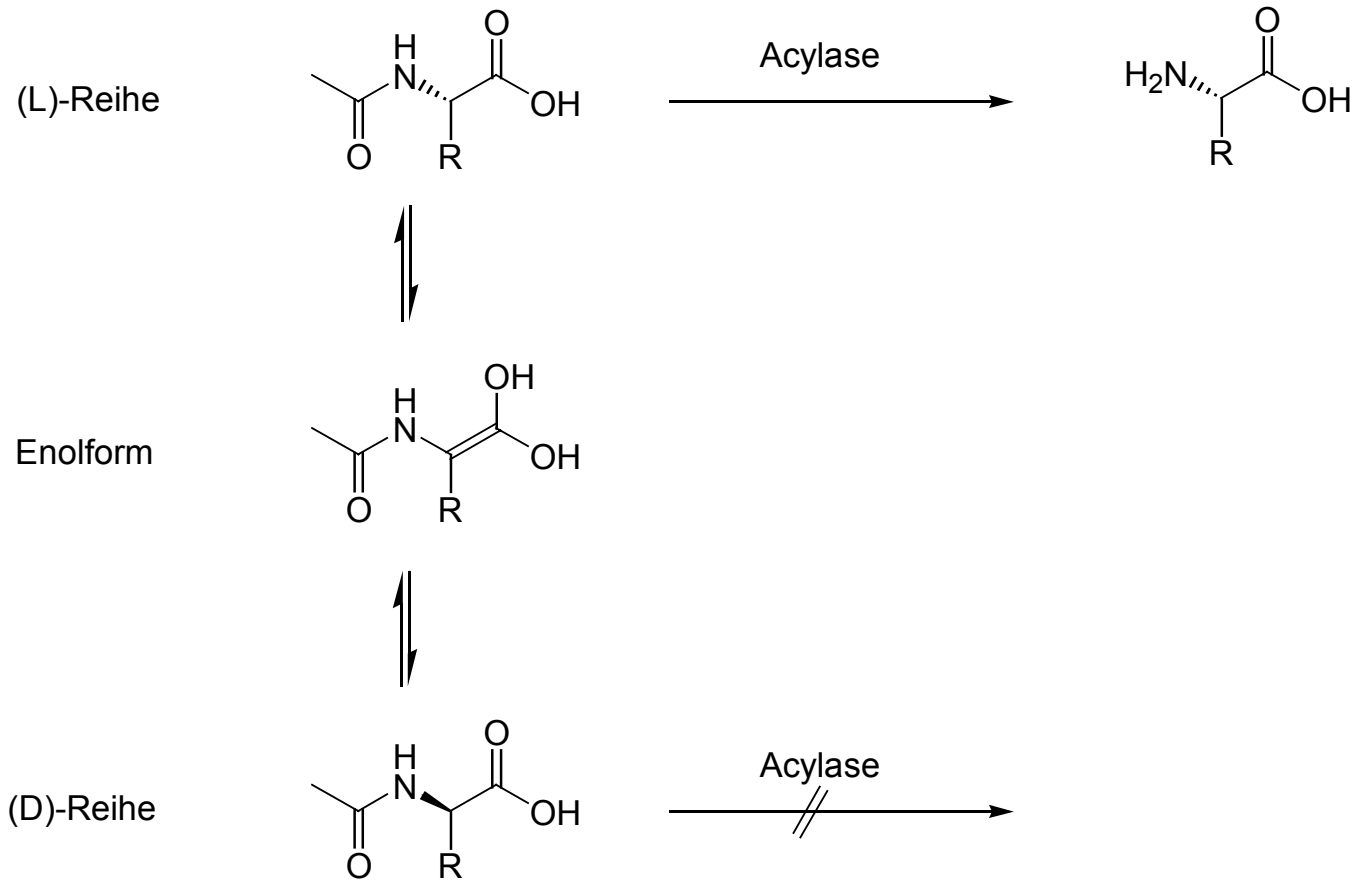
(S)-



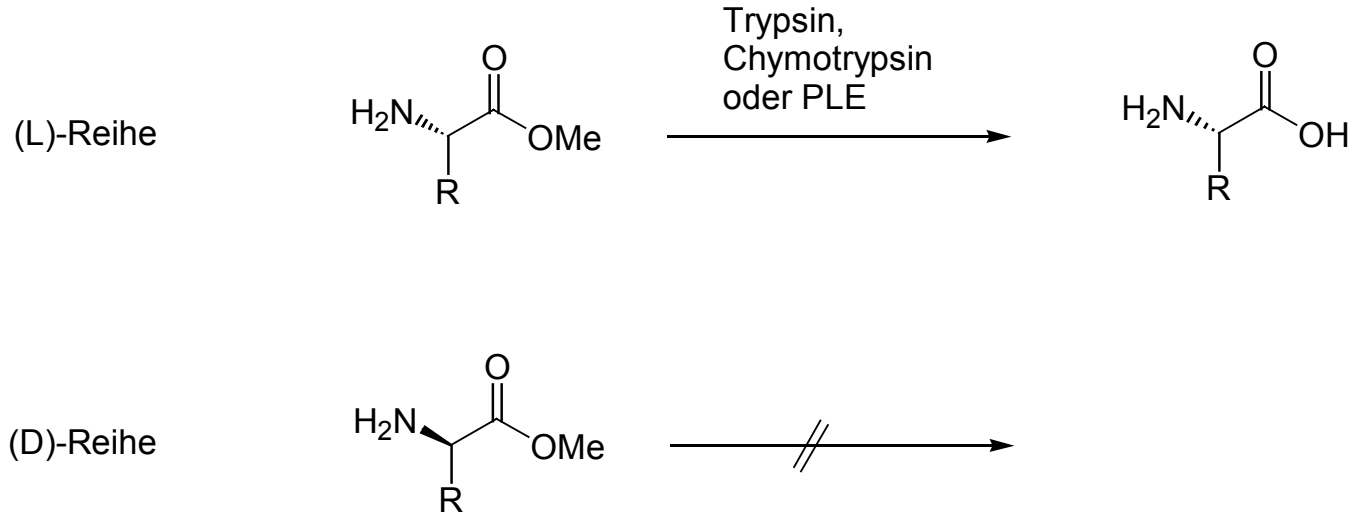
"chemische" Hydrolyse
zu (S)-Ibuprofen



Enzymatische Racematspaltung (2):



Enzymatische Racematspaltung (3):

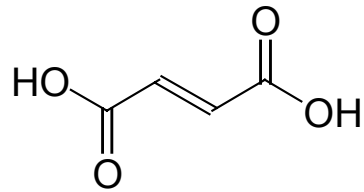


Nachteile:

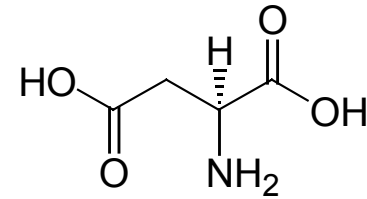
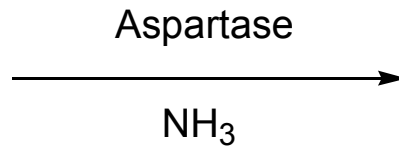
- racemische Vorstufen nötig
- Antipode bleibt als Abfall übrig



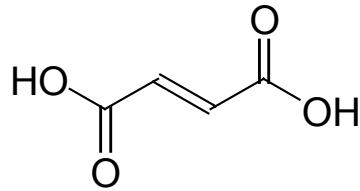
Asymmetrische Addition an eine C-C-Doppelbindung:



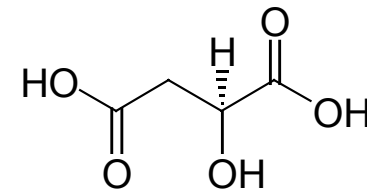
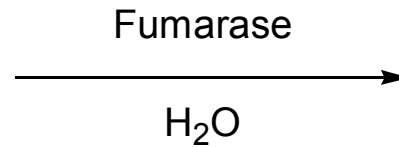
Fumarsäure



L-Asparaginsäure



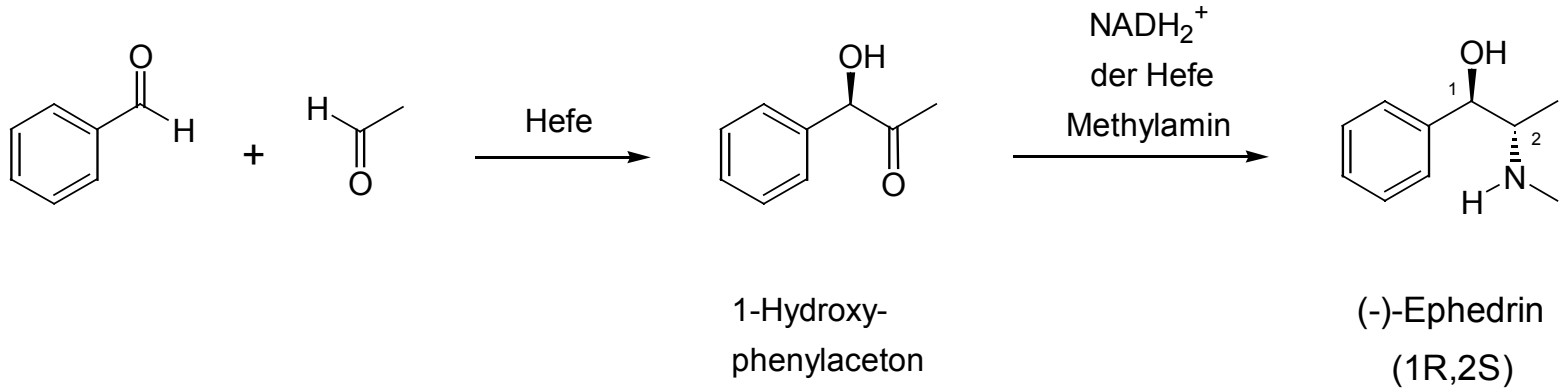
Fumarsäure



L-Äpfelsäure



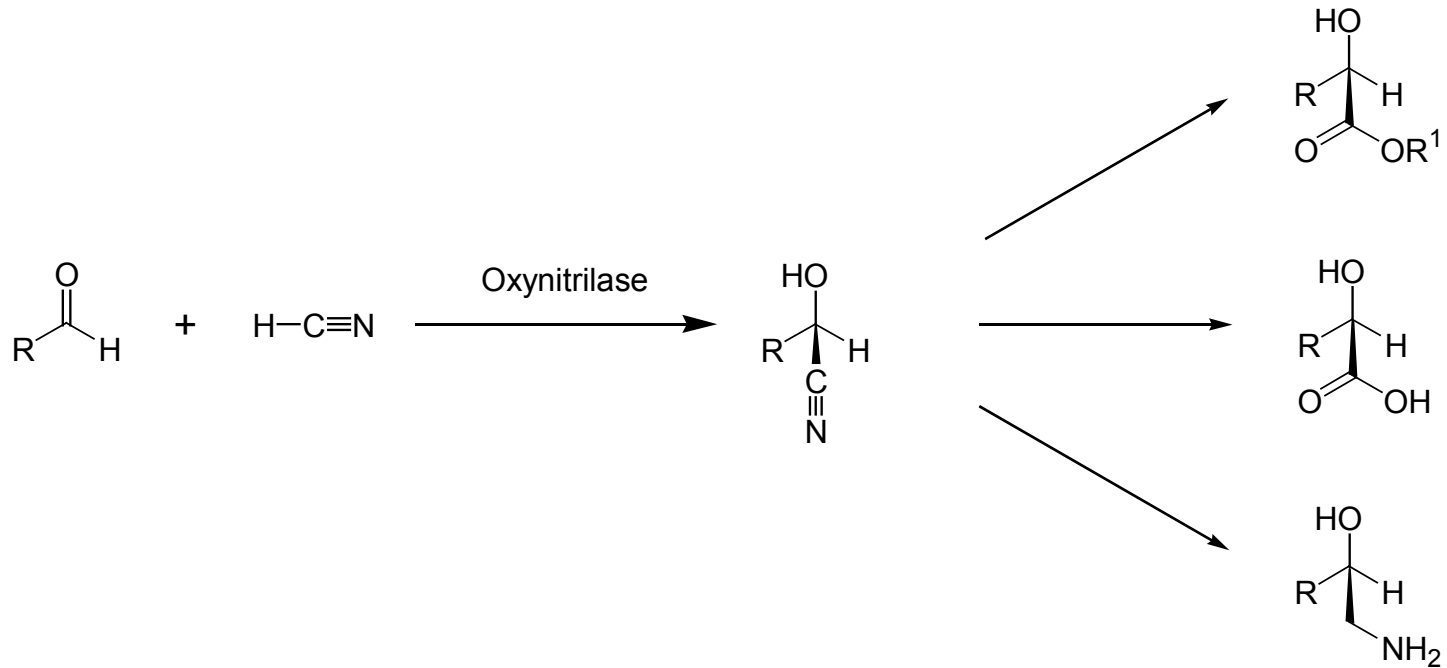
Stereoselektive Synthese von Ephedrin:



Neuberg 1921: Gärende Hefe + Glucose-Lösung + Benzaldehyd + Methylamin



Selektive Addition von Blausäure an prochirale Aldehyde:



Die enzymkatalysierte Addition von HCN erfolgt selektiv von der *Si*-Seite.
Oxynitrilasen werden in immobilisierter Form eingesetzt.



Immobilisierte Enzyme:

In einem Verfahren das gelöste oder suspendierte Enzympräparationen nutzt, ist der Biokatalysator am Ende des Produktionsprozesses vom Produkt kaum abtrennbar. Meistens kann der Biokatalysator nicht in aktiver Form rückgewonnen werden.

Im Gegensatz dazu können immobilisierte Enzyme durch einfache Trennverfahren (z.B. Filtration) aus der produktthaltige Fermentationsbrühe rückgewonnen werden.

Dadurch wird ein kontinuierlicher Einsatz der wertvollen Katalysatoren in einem entsprechend ausgestatteten Bioreaktor möglich und es kann eine vergleichsweise hohe volumetrische Produktivität erreicht werden.

Die Immobilisierung von Enzymen wird durch die Anwendung geeigneter chemischer oder physikalischer Methoden erreicht.

Enzyme werden durch Adsorption oder kovalente Bindung an polymere Träger fixiert. Auch eine Polymerisierung der Enzyme zu unlöslichen Komplexen ist denkbar.



Da Enzyme verhältnismäßig große Moleküle sind, können diese in einer feinmaschigen Polymermatrix oder in einem membranumschlossenen Kompartiment an der freien Diffusion gehindert und damit fixiert werden.

Die immobilisierten Enzyme müssen aber für die Substrate und für die Cofaktoren zugänglich bleiben !

Dies ist für Enzyme mit fest gebundener prosthetischer Gruppe einfacher als für Enzyme, die eine ständige Regeneration des reaktiven Zentrums durch Coenzyme benötigen.



Immobilisierungsmethoden:

Immobilisierung durch Adsorption:

Die Immobilisierung erfolgt durch Adsorption an einen unlöslichen Träger.

- das Enzym wird durch die van-derWaals-Kräfte festgehalten
- das Enzym wird durch Wasserstoffbrücken festgehalten
- das Enzym wird durch ionische Kräfte festgehalten (z.B. an Anionenaustauscher)

Vorteile: einfach herzustellen, Matrixbindung reversibel

Nachteile: Bindung nur schwach und labil (abhängig von pH, Temperatur,...)

Immobilisierung durch kovalente Bindung:

Reaktive Gruppen des Enzyms (SH-Gruppen, ω -Aminogruppen, ...) können direkt mit geeigneten Gruppen des Trägermaterials reagieren.

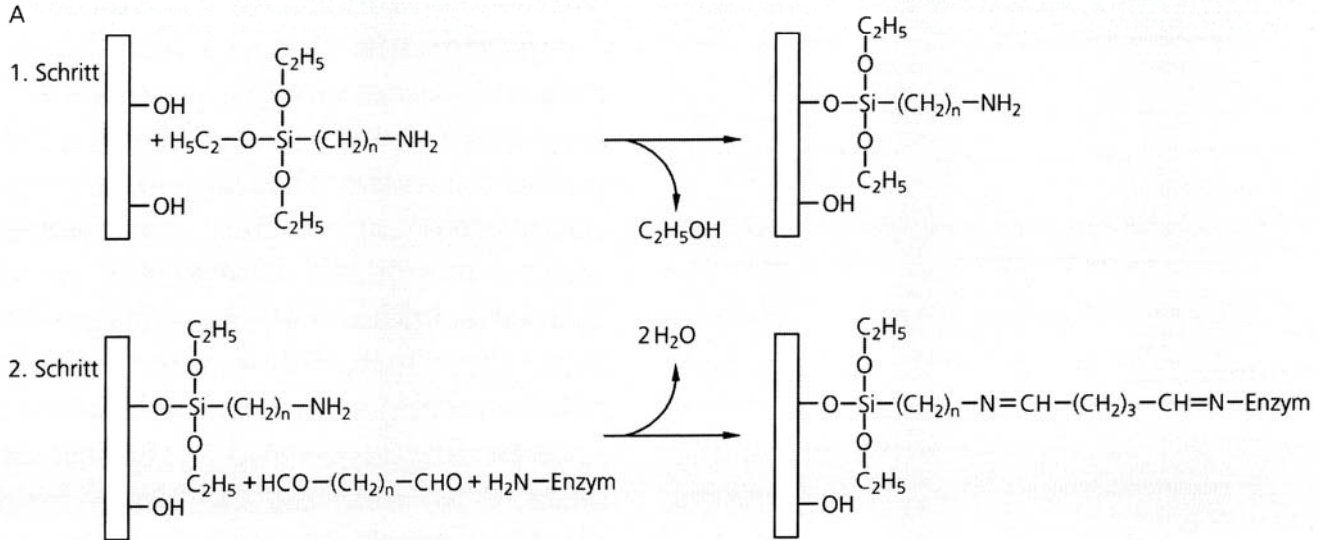
Weniger reaktive Stellen des Enzyms (OH-Gruppen an Serin oder Threonin) müssen für eine chemische Reaktion erst aktiviert werden.

Aus räumlichen Gründen ist es meistens nötig ein Spacermolekül (=Abstandshalter) zwischen Enzym und polymerem Träger zu plazieren.

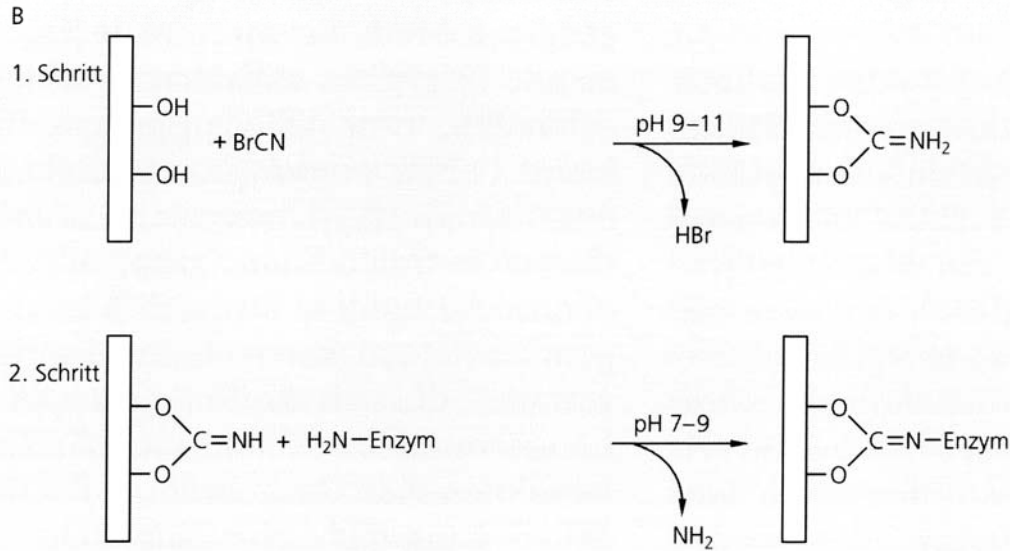
Die Bindungsstellen im katalytischen Zentrum des Enzyms dürfen nicht betroffen sein !
Auch eine sterische Behinderung durch das Trägermaterial führt zum Aktivitätsverlust !



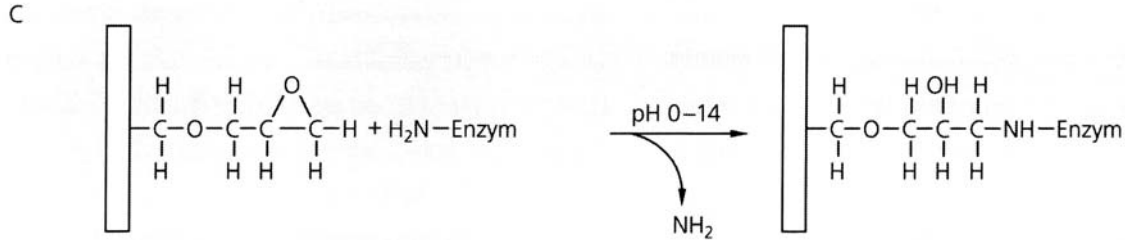
Immobilisierung von Enzymen durch kovalente Bindung (1)



Immobilisierung von Enzymen durch kovalente Bindung (2)



Immobilisierung von Enzymen durch kovalente Bindung (3)



Trägermaterialien:

- Aluminiumoxid, aktiviertes poröses Glas
- Stärke, Zellulose, Agarose
- synthetische Träger



Einschlußimmobilisierung:

- Biokatalysatoren können in eine Polymermatrix eingeschlossen werden.

Bei der Polymerisierungsreaktion darf das reaktive Zentrum des Enzyms nicht betroffen sein, da sonst die katalytische Aktivität verloren geht.

Die Polymerketten müssen jedenfalls weitmaschig genug sein, damit der Zugang für Substrate und für die Cofaktoren unbehindert bleibt.

- Der Einschluß des Enzyms kann auch in Mikrokapseln oder Liposomen erfolgen.

Vorteil:

Bei der Mikroverkapselung sind die Größe und die Wandstärke der Kapseln durch das Herstellungsverfahren steuerbar.

Nachteile:

geringe Stabilität der Immobilisate und schlechte Rückgewinnbarkeit der Enzyme



Enzymreaktoren:

Die effektivste Form der Nutzung eines technischen Enzyms ist seine kontinuierlicher Einsatz in einem Bioreaktor.

Membranreaktor:

Das katalytisch aktive Makromolekül wird durch eine semipermeable Membran zurückgehalten, während das niedermolekulare Substrat und das Produkte durch die Membran durchtreten können.

Die Enzyme können - entsprechende Stabilität des Katalysators vorausgesetzt - mehrfach und kontinuierlich verwendet werden.

Im technischen Betrieb haben sich Ultrafiltrationsmembranen auf der Basis organischer Polymere wie Polyamid bewährt.

Künstliche Membranen sind zwar nicht so selektiv wie die biologischen Vorbilder, sie können dafür aber mit definierter Stabilität, Porenform und Porengröße hergestellt werden.

Einfache Membranreaktoren kann man mithilfe eines mit Enzymlösung gefüllten Dialyseschlauches konstruieren.

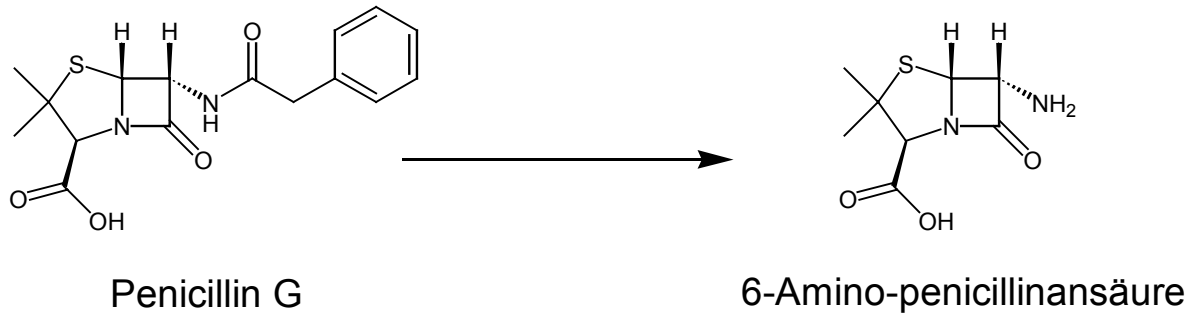


Einsatz immobilisierter Enzymen:

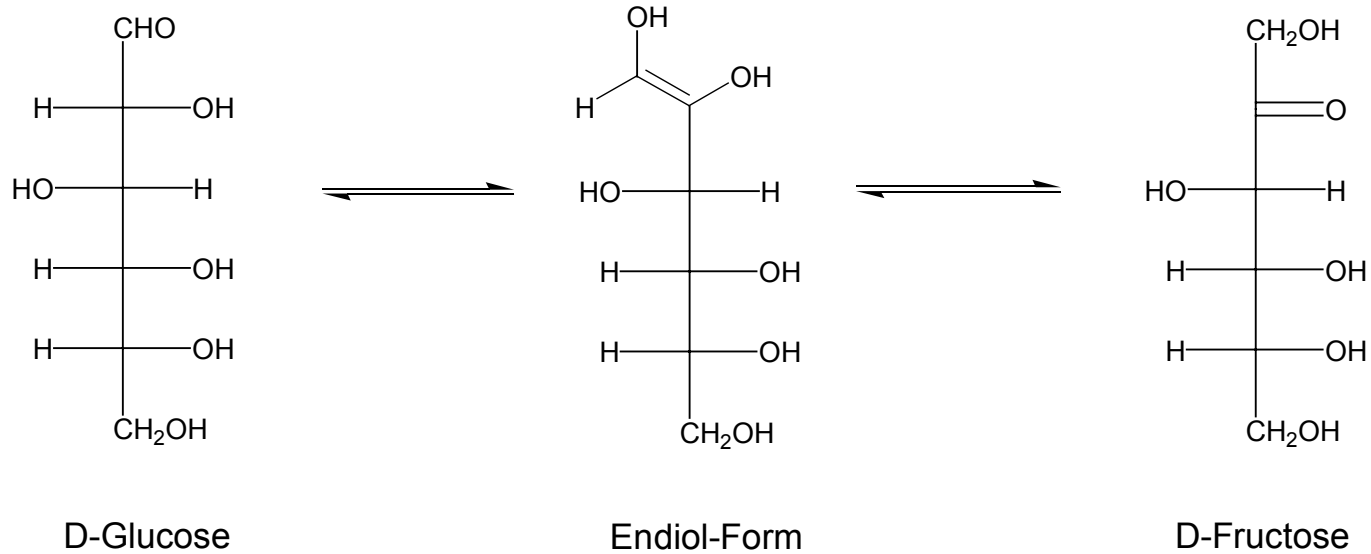
Der Biokatalysator ist an einen geeigneten Träger gebunden und das Edukt wird in einem kontinuierliche Strom daran vorbeigeleitet, sodaß eine hohe volumetrische Produktivität resultiert.

Beispiele:

- Herstellung von 6-Aminopenicillansäure mit immobilisierter Penicillinacylase



- Isomerisierung von Glucose mit immobilisierter Glucoseisomerase

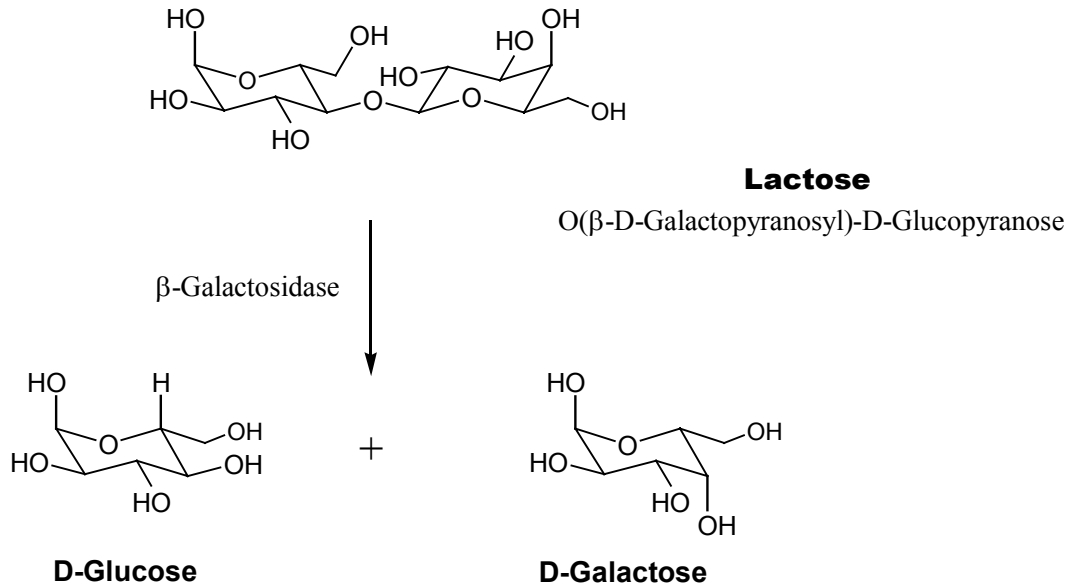


D-Fructose ist ein wichtiger Zuckerersatzstoff für Diabetiker



Membranverfahren zur enzymatischen Hydrolyse von Lactose:

Weltweit ist eine Zunahme der Zahl an Konsumenten mit mehr oder weniger ausgeprägter Lactoseintoleranz (Milchzuckerunverträglichkeit) zu konstatieren. Betroffen sind zirka 70 % der Weltbevölkerung, insbesondere bestimmte ethnische Gruppen (in Finnland bis zu 15 %), sowie Kinder und durch die steigende Lebenserwartung immer mehr ältere Menschen.



Verursacht wird diese Lactoseintoleranz durch den Mangel an dem Lactose spaltenden Enzym β -Galactosidase, der dazu führt, dass die in herkömmlichen Milch- und Milchprodukten enthaltene Lactose vom Körper nicht verwertet werden kann. Es kommt zu Blähungen und osmotischen Effekten (Durchfall).

Neben der Zugänglichkeit von Milch- und Milchprodukten für Menschen, die an Lactoseintoleranz leiden, treten einige technologische Vorteile in den Vordergrund. Es kommt durch die Lactosespaltung in Glucose und Galactose zu massiven Steigerungen der Löslichkeit und der Süßkraft (bei gleichem Kaloriengehalt).

Weiters wird durch die Verdopplung der reduzierenden Enden die energetische Nutzung beschleunigt und die Bräunungskraft für die Maillardreaktion verstärkt.

Das hier vorgestellte, neuartige Verfahren zur enzymatischen Lactosehydrolyse wurde von der Universität für Bodenkultur Wien (Institut für Lebensmitteltechnologie) und der Firma Lactoprot Alpenländische Milchindustrie und Handels AG entwickelt und in Betrieb genommen.

Es stellt eine Kombination aus der Enzym,- Membran,- und Milchtechnologie dar. Aus diesen Gebieten ergeben sich die Problemstellungen der Enzymstabilisierung, des unmittelbaren Enzymverlustes und der Umsetzungsoptimierung.



Mittels Ultrafiltration werden Substrat (Milch, Molke) und Enzym räumlich getrennt, was bewerkstelligt, dass kein Enzym im Produkt zu finden ist.

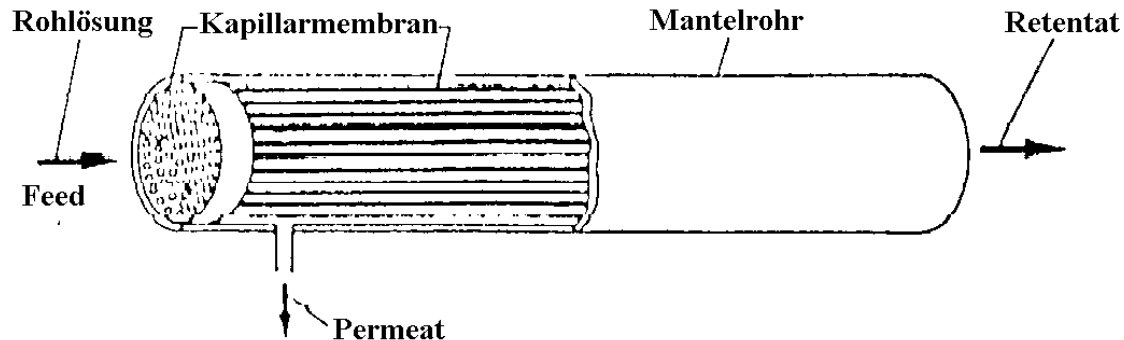
Dies ist ein wichtiges Argument zur Konsumentenüberzeugung.

Das Membransystem ermöglicht weiters, dass die Aktivität des Enzyms solange wie möglich ausgenützt wird.

Lactose, niedermolekulare Proteine und Salze treten durch diffusiven Stoffübergang von der Milch über die Membran in den Enzymraum.

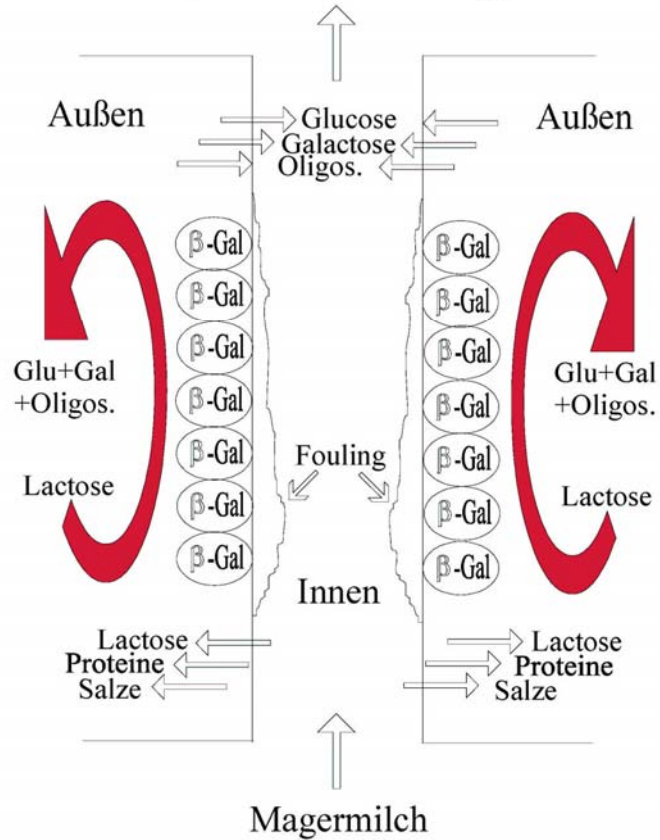
Dort wird die Lactose durch das Enzym in Glucose und Galactose gespalten.

Die Reaktionsprodukte diffundieren ihrerseits in das Substrat (Milch, Molke) zurück.



Reaktionsablauf im Kapillarrohr:

Lactosereduzierte Magermilch
mit Glucose, Galactose und Oligosacchariden



Zur Stabilisierung der Enzymlösung werden Mikrofiltration und UV-Bestrahlung eingesetzt, wobei die UV-Technologie im Zusammenhang mit Enzymen eine weitere Neuheit darstellt.

Im Zusammenhang mit der Membrantechnologie tritt das Problem des Fouling (Ablagerungen an den Membranoberflächen hauptsächlich durch Adsorption) auf. Dieses wird durch Spülvorgänge während der Produktion gelöst.

Ein entscheidender Parameter für dieses Verfahren ist die Temperatur, die sowohl die Enzymaktivität und das Mikroorganismenwachstum als auch den diffusiven Stoffübergang beeinflusst.

Die Lactosekonzentration und die Durchflussraten des Substrates (Milch, Molke) sind für die Diffusion und somit für den Hydrolysegrad mitentscheidend.

Dieses neuartige Verfahren ermöglicht je nach Kundenwunsch Produkte mit unterschiedlichen Hydrolysegrad herzustellen, wie zum Beispiel lactosereduziertes sprühgetrocknetes Magermilchpulver, Molkepulver oder auch Molkekonzentrate (auch teilentmineralisiert).

Aufgrund seiner positiven Eigenschaften als Nahrungsergänzungstoff kann das lactosereduzierte Magermilchpulver zum Beispiel in Eiscreme, Süßwaren, Desserts, Backwaren, Kindernahrung, Sportlernahrung, etc. eingesetzt werden.

