

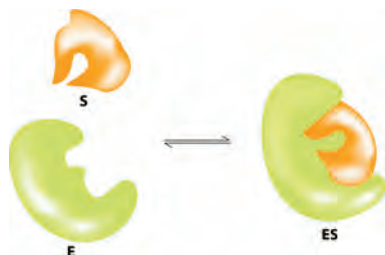
Kunstige enzymer

Enzymer har en enestående evne til at accelerere kemiske processer. Der forskes målrettet i at optimere enzymer baseret på cyclodextrin

Af Jeannette Bjerre, Lavinia Marinescu og Mikael Bols, Kemisk Institut, Aarhus Universitet

Enzymer er biologiske katalysatorer, der muliggør forløbet af livsnødvendige biokemiske processer i og uden for cellerne, som ikke ville finde sted i tilstrækkelig grad uden katalyse. Enzymer hjælper os med at fordøje føden og bistår kroppens celler i at omdanne næringsstofferne i maden til nyttige energiformer for muskler og hjerne. Vha. enzymer bliver gifte og affaldsstoffer omdannet til en form, så de kan udskilles. Endvidere fremskynder enzymer processer ved genopbygning og vækst af væv. Enzymer har en fabelagtig evne til at accelerere reaktioner. I visse tilfælde kan et enzym få en kemisk reaktion, der ellers ville tage milliarder af år, til at forløbe på få sekunder.

Enzymer er derfor helt grundlæggende for organismen og livet som helhed. De har stor industriel anvendelse og findes i mange af de produkter, vi benytter i dagligdagen, herunder vaskepulver, kontaktlinsevæske og shampoo. Den industrielle fremstilling af alkoholiske drikke og mælkeprodukter er afhængig af enzymer, og de anvendes hyppigt til optimering og effektivisering af diverse kemiske reaktioner, da enzymer miljømæssigt er at foretrække frem for brugen af toksiske kemikalier.



Figur 1. Enzym (E) binder deres substrater (S) specifikt for at kunne udføre katalyse. Katalysen foregår ved nærhedseffekter.

Enzymer er oftest opbygget af proteiner, men kan have andre former. Naturligt forekommende enzymer er meget selektive ift. det kemiske stof, hvis omdannelse de katalyserer, kaldet substratet. Denne selektivitet ift. substrat skyldes, at det katalytiske funktionelle område i enzymet – kaldet det aktive site – har en speciel tredimensionel opbygning, der kun tillader god binding af substrater, der størrelses- og polaritetsmæssigt passer ind. Dette gør at enzymer kan skelne strengt mellem substrater, selvom de befinder sig i et biologisk miljø med tusindvis af forskelligartede molekyler (figur 1).

Den enzymatiske katalyse af en reaktion opnås ved, at enzymet binder og fastholder substratet i en katalyse-mæssig velegnet konformation, der maksimerer bindingsinteraktionerne for det videre forløb. Dette sænker »transition state«-energien, således at reaktionen forløber meget hurtigere, end den ellers ville have gjort.

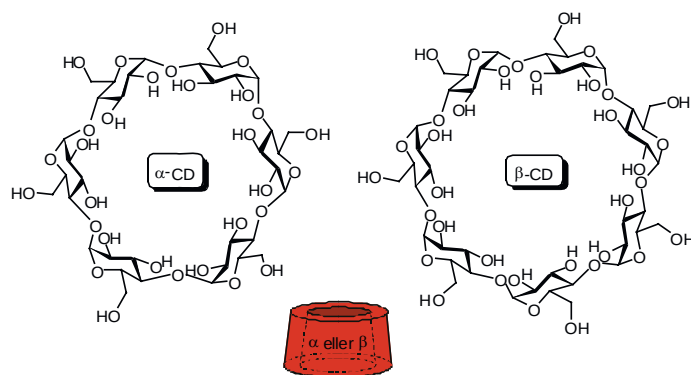
Det aktive site i enzymet udgør som regel kun en lille del af den samlede omfattende struktur. Ved at efterligne denne lille del, som er ansvarlig for katalysen, bør man kunne fremstille et kunstigt enzym, der er i stand til at accelerere biologiske eller kemiske reaktioner, men uden de katalyse-mæssigt overflødige strukturer, der findes i de naturlige enzymer. Effektiviteten pr. vægtenhed kan derfor blive større i kunstige enzymer end i deres naturlige forekommende slægtninge. Der er derfor teo-

retisk set et meget stort potentiale for at skabe kemiske stoffer med egenskaber, man i dag kun kan drømme om, som f.eks. kemikalier der selv finder og omsætter et target-molekyle i en kompleks blanding, katalysatorer med uhørt effektivitet under miljøvenlige forhold eller lægemidler, der selv finder og kemisk modificerer deres »target«.

Udfordringen i at designe kunstige enzymer, der kan hamle op med selektiviteten og potensen af de enzymer man finder i naturen, og som er resultatet af millioner års evolution, er imidlertid betydelig. Denne artikel omhandler arbejde, der er udført på Aarhus Universitet, hvor det er lykkedes os at fremstille kunstige enzymer, baseret på cyclodextriner, der er i stand til at få kemiske reaktioner til at forløbe op til 60.000 gange hurtigere.

Cyclodextriner

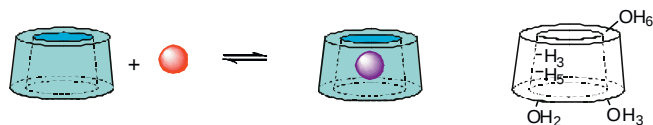
De kunstige enzymer vi har designet er alle baseret på cyclodextriner, som er ringformede molekyler sat sammen af glucoseenheder. De mest almindelige cyclodextriner indeholder 6, 7 eller 8 glucose-enheder og kaldes henholdsvis α -, β - og γ -cyclodextrin (figur 2).



Figur 2. De to mest almindelige cyclodextrin molekyler, α -cyclodextrin (til venstre) og β -cyclodextrin (til højre) som består af henholdsvis 6 og 7 glucose molekyler. Den røde figur er en simplificeret repræsentation af cyclodextrin molekylet.

Grunden til at cyclodextrinerne er interessante udgangspunkter for udviklingen af et kunstigt enzym er, at de har en tredimensionel struktur med form som en kegle, som kan binde gæstemolekyler i sit indre (figur 3). Placeringen af de funktionelle grupper i keglestrukturen gør, at strukturen besidder en lipofil (fedtopløselig) indre kavitet og et hydrofilt (vandopløseligt) ydre. Cyclodextrinerne er derfor i stand til at binde mindre lipofile organiske stoffer i vandig opløsning, ved at indlemme dem helt eller delvist i kaviteten. Afhængig af valget af cyclodextrin og hvorledes man forandrer den kemisk, kan man opnå substratselektivitet ved indkapslingen, en egenskab man også finder hos de naturlige enzymer. Størrelsen er i den sammenhæng vigtig; Den mindste almindeligt forekommende cyclodextrin, α -cyclodextrin, kan rumme slanke strukturer som f.eks. fedtsyrekæder. β -cyclodextrin er lidt større og har plads til kolesterol, forgre- ►

nede kædestrukturer og phenylringe, mens γ -cyclodextrin er stor nok til at danne et lille inklusionskompleks med den store fodboldlignende kulstofforbindelse, Buckminsterfulleren (C_{60}).



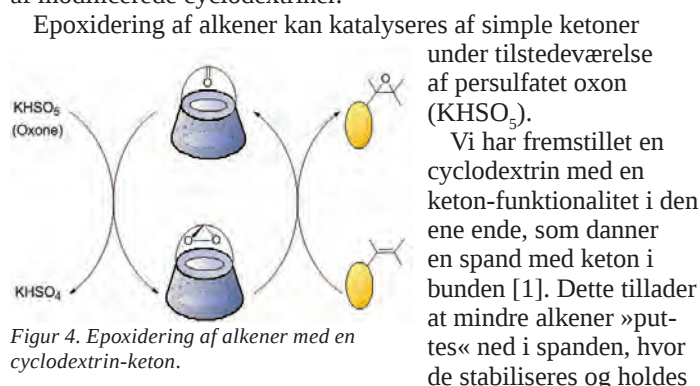
Figur 3. Interessen for cyclodextrin molekylerne skyldes deres evne til at danne inklusionskomplekser. Små lipofile molekyler bindes i kaviteten med betydelig affinitet som vist til venstre. Hydroxylgrupperne og hydrogenatomerne i sukermolekylerne er placeret som vist til højre: 2-OH- og 3-OH-grupper sidder på den brede åbning, 6-OH på den smalle og 3-H og 5-H sidder inde i kaviteten.

På kanten af den øvre rand af keglestrukturen befinder 6-OH-sukkeralkohol-grupperne sig, det er nogle af disse, der er basis for de kemiske modifikationer, der er foretaget på α - og β -cyclodextrinerne, for at forbedre deres evner som kunstige enzymer (figur 3).

Cyclodextrinerne er både vandopløselige og ugiftige nok til at kunne spises. De anvendes i dag til aromabevarelse i en række fødevarer, såsom te og pulverkaffe, samt i lægemiddelformuleringer og i den kemiske industri. Vandopløselighed, ugiftighed og evnen til at danne inklusionskomplekser, gør cyclodextrinerne til glimrende kandidater for udviklingen af kunstige enzymer.

Epoxidaser

Epoxideringsreaktioner er vigtige inden for organisk syntese, og er en af de reaktionstyper vi har designet katalysatorer til, i form af modificerede cyclodextriner.



Figur 4. Epoxidering af alken med en cyclodextrin-keton.

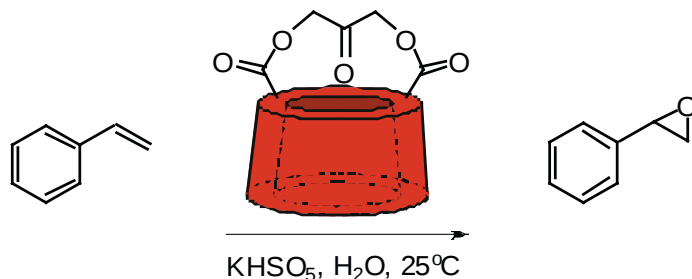
på plads af hydrofobe interaktioner og kan epoxideres under tilstedeværelse af oxon. Keton-funktionaliteten sidder som del af en ketoester-bro, der spænder over keglestrukturens øvre rand og forbinder to modsatstillede glucoseenheder. For at aktiveres til epoxidering af alken skal ketoesteren først selv oxideres af oxon, som herved reduceres til svovlsyre. Den epoxiderede cyclodextrin-spand er nu klar til at modtage en gæst til epoxidering i kaviteten. Ved epoxidering af gæstmolekylet genskabes cyclodextrinen i dens oprindelige ketoester-form (figur 4).

Ved hjælp af inhiberingseksperimenter har vi bevist, at epoxidering forudsætter binding af substratet inde i selve cyclodextrin-kaviteten. Dertil udviser cyclodextrin-derivaterne substratgenkendelse og fungerer kun med visse typer substrater; de modificerede cyclodextriner besidder således grundlæggende enzyમેgenskaber.

Vi har fremstillet flere slags cyclodextriner af denne type, den bedste epoxideringskatalysator er vist i figur 5 og blev fremstillet både i α - og β -cyclodextrin-versionen [2].

En række stoffer blev undersøgt som substrater i cyclodextrin-katalyserede epoxideringsreaktioner, og i de fleste tilfælde fik cyclodextrin-derivaterne reaktionen til at forløbe både hurtigere og med højere udbytte af produktet, end uden cyclodextrin-derivat til stede.

Eksempelvis, ved epoxidering af stoffet styren under tilste-



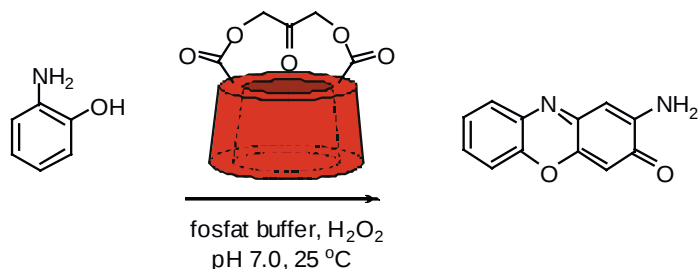
Figur 5. Epoxidering af styren katalyseret af en cyclodextrin-keton. Reaktionen giver 100% omsætning efter en time og op til 45% selektivitet for dannelse af den ene stereoisomer.

deværelse af oxon blev fuldstændig omdannelse opnået, en reaktion der med cyclodextrin-derivat til stede oven i købet favoriserede den ene spejlbilledform af produktet frem for den anden med ca. 45%.

Oxidaser

Simpel oxidation er endnu en reaktionstype, vi har designet cyclodextrin-baserede kunstige enzymer til. Oxidaser, enzymer der katalyserer oxidationsreaktioner, har vi utallige af i kroppen. I leveren er det eksempelvis en række oxidase-enzym, der sørger for omdannelsen af de fleste lægemidler, så de efterfølgende kan udskilles i urinen.

Oxidation af aminer kan ske under tilstedeværelse af ketoner som katalysatorer, samt brintoverilte (H_2O_2) til at gendanne keton-katalysatoren efter hver katalyserede reaktionsrunde, dvs. brintoverilte fungerer som en cooxidant for katalysatoren. Eftersom brintoverilte er ganske ugiftig, er den et attraktivt miljørigtigt valg som cooxidant, men desværre har oxidationsreaktioner med brintoverilte en høj aktiveringsenergi og dermed svært ved at forløbe af sig selv. Her kommer enzymatisk katalyse ind i billedet, da enzymer som nævnt netop fungerer ved at nedsætte reaktionens aktiveringsenergi, så de forløber hurtigere (figur 6).



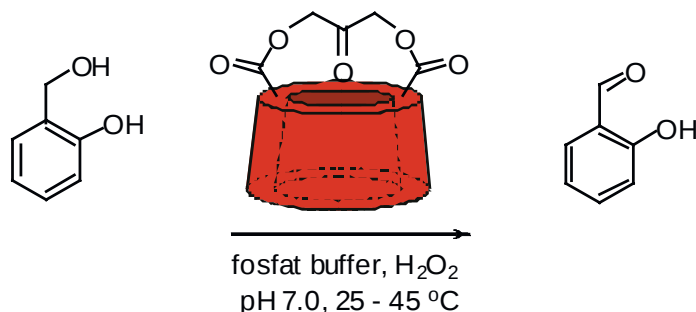
Figur 6. Oxidation af aminer med en cyclodextrin-keton og brintoverilte som cooxidant. Reaktionen er hurtig og giver nitroforbindelser eller som vist her et kondensationsprodukt fra nitrosoforbindelsen.

Tidligere omtalte keton-holdige cyclodextrin har ikke kun effekt som epoxidase, men er også i stand til at katalysere oxidation af aminer. Nedenfor (figur 7) er vist en cyclodextrin-katalyseret oxidationsreaktion med brintoverilte (støkiometrisk mængdeforhold) af o-aminophenol til et tricyklisk stof, hvis fremkomst og mængde vi kan måle vha. UV-lys [3].

Den keton-holdige cyclodextrin er i stand til at få ovenstående reaktion (figur 6) til at forløbe 1070 gange hurtigere, end den ellers ville. Reaktionen følger Michaelis-Menten-kinetik, et særligt hastighedsmønster man også ser for mange naturligt forekommende enzymer, og cyclodextrin-derivatet udviser substratgenkendelse. Der er således adskillige fællestræk med de naturlige enzymer at spore for den cyclodextrin-medierede katalyse, som viser, at cyclodextrinen fungerer som et kunstigt enzym.

Meget kraftig katalyse ved oxidation af benzyl-alkoholer

Oxidase-enzym-historien ender ikke ved aminerne, idet vi siden hen opdagede, at denne keton-holdige cyclodextrin, atter med brintoverilte til stede, er i stand til at katalysere oxidationen af benzyliske alkoholer til aldehyder under enzymatiske betingelser (pH 7, 25 - 45°C) [4]. Vi fandt en grad af katalyse, der er helt uden sidestykke – nedenstående reaktion forløber op til 60.000 gange hurtigere med cyclodextrin-katalyse end uden.



Figur 7. Oxidation af alkoholer katalyseres af en cyclodextrin-keglen. I dette tilfælde sker oxidationen op til 60.000 gange hurtigere, når alkoholen er bundet til cyclodextrinen, end når den er fri i opløsning.

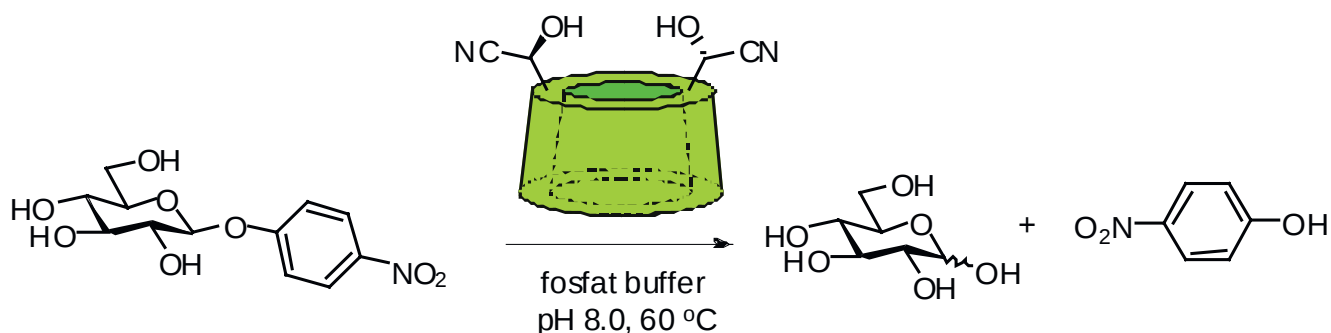
Det er første gang et kunstigt enzym under milde, enzymatiske betingelser har udvist en så høj grad af effektivitet. Naturlige enzymer er dog stadig en del mere effektive katalysatorer, men da de samtidig vejer meget mere end cyclodextrinerne, er katalysen pr. vægtenhed omtrent den samme som for cyclodextrin-enzymene.

De gode resultater tegner godt for fremtidige anvendelsesmuligheder af cyclodextrin-derivaterne som kunstige enzymer.

Glycosidaser

Mange enzymer fungerer som glycosidaser, dvs. de kløver glycosidbindinger og frigiver herved glucose. Lysozym, som kan spalte visse glycosidbindinger i bakterielle cellevægge, er et eksempel på en naturligt forekommende glycosidase. Glycosidbindingen er i vandig opløsning, under ikke-katalyserede forhold og neutral pH-værdi eller derover, meget stabil. Uden katalyse er halveringstiden for nedbrydningen af cellulose ved neutrale betingelser beregnet til næsten 5 millioner år. For at fordøje stivelse er vi selv dybt afhængige af fordøjelsesenzym glycosidaser, der gør os i stand til at optage og udnytte energien fra f.eks. kartofler, ris og fuldkornsprodukter. Nogle giftstoffer fra planter, eksempelvis hestekastanjer, indeholder også glycosidbindinger og kan uskadeliggøres ved kløvning af disse.

Det er derfor klart, at glycosidaser har en vigtig opgave foran sig, og i gruppen har vi fremstillet cyclodextrin-derivater, der er i stand til at fungere som kunstige glycosidaser.



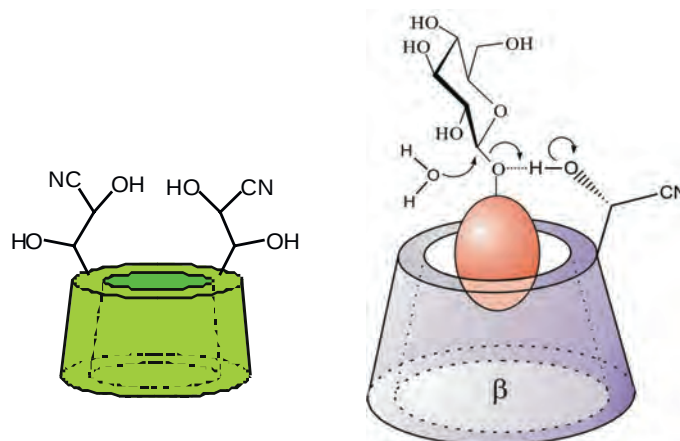
Figur 8. Hydrolysen af glycosider katalyseres af en cyclodextrin-dicyanohydrin. I dette tilfælde sker reaktionen 10.000 gange hurtigere, når substratet sidder bundet til cyclodextrinen frem for uden for.

Vi undersøgte, i hvor høj grad cyclodextrin-derivater var i stand til at katalysere kløvningen af substrater, der indeholdt en sukkerdel koblet til en phenylgruppe via en glycosidbinding.

Ved kløvning af den type substrater fås et monosaccharid – f.eks. glucose, maltose eller galactose – samt en phenol (hvis fremkomst og mængde vi kan måle med UV-lys, og dermed se hvor meget substrat, der er blevet kløvet og følge, hvor hurtigt kløvningen sker).

Vi fandt en glimrende katalysator for denne type kløvningsreaktioner i de såkaldte cyclodextrin-dicyanohydriner [5], hvor det bedste kunstige enzym var dicyanohydrinen af β -cyclodextrin (figur 8) [6].

Under tilstedeværelse af denne dicyanohydrin forløb kløvningen af phenyl-glycosiderne op til 10.000 gange hurtigere end uden cyclodextrin-dicyanohydrin – en hastighedsforøgelse, der for kunstige glycosidasers vedkommende er uden sidestykke. Tilsvarende positive resultater blev opnået for en dicyanohydrin, hvor den katalytiske gruppe er flyttet et kulstofatom længere ud (figur 9).



Figur 9. Til venstre er vist en dicyanohydrin hvor cyanohydringruppen er flyttet et kulstofatom længere ud. Til højre er vist en sandsynlig mekanisme for katalysen.

Meget tyder på, at cyclodextrin-katalysen forløber som vist i figur 9, med den fedtopløselige phenyldel af substratet nedsænket i cyclodextrin-kaviteten, mens sukkerdelen med glycosidbindingen stikker uden for og bliver kløvet vha. en cyanohydrin-gruppe på kanten af cyclodextrin-keglen.

Vha. inhiberingseksperimenter har vi nemlig vist, at katalyse af kløvningen krævede, at sukkerstof-substratet bandt sig inde i cyclodextrin-kaviteten, samt vist at cyclodextrinen udviste substratgenkendelse. Endelig fulgte kløvningsreaktionen ►

med cyclodextrin-dicyanohydrin Michaelis-Menten-kinetik, ligesom mange naturlige enzymer. Disse cyclodextrin-dicyanohydriner fungerer med andre ord på mange måder fuldstændigt som naturlige enzymer, selvom de er skabt i et laboratorium.

Fremtiden

Vi arbejder i gruppen fortsat på at optimere og forbedre cyclodextrin-derivaterne til synteserelaterede og biomimetiske reaktioner. Det er lykkedes at fremstille de første kunstige glycosidaser, og undersøgelser er i gang for at afdække, om disse stoffer kan anvendes til at nedbryde giftige glycosider. For nylig har vi designet det hidtil mest effektive kunstige enzym til katalyse af oxidation under neutrale enzymatiske betingelser, med hastighedsforøgelse på hele 60.000 gange. Katalysen pr. vægtenhed enzym er derved oppe på ca. det samme for cyclodextrin-derivaterne som for flere naturligt forekommende enzymer, og vi er i gang med at undersøge mulighederne for

anvendelse af disse stoffer som meget miljøvenlige katalysatorer i syntese.

E-mail-adresser

Jeannette Bjerre: jeannette.bjerre@mail.dk

Lavinia Marinescu: Lavinia@chem.au.dk

Mikael Bols: mb@chem.au.dk

Referencer

1. Rosseau, C.; Christensen, B.; Petersen, T. E.; Bols, M. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 3476-3482
2. Rosseau, C.; Christensen, B.; Bols, M. *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 2734-2739
3. Marinescu, L.; Mølbach, M.; Rousseau, C.; Bols, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 17578-17579
4. Marinescu, L. G.; Bols, M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 4590-4593
5. Ortega-Caballero, F.; Rosseau, C.; Christensen, B.; Petersen, T. E.; Bols, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 3238-3239
6. Ortega-Caballero, F.; Bjerre, J.; Laustsen, L. S.; Bols, M. *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 7217-7226

KIKS VED THORVALD PEDERSEN

Om ænder og gæs – om vinteren

Hvorfor fryser ænder og gæs ikke stive om vinteren? Er deres fedtstof baseret på lavmolekylære eller måske på umættede fedtstoffer? Det var essensen af et spørgsmål fra apoteker Bent Lynggaard i Brovst. I Belitz, Grosch og Schieberle's »Lebensmittelchemie« fandt jeg disse oplysninger om fedtstofferne (Schmalz) i gæs og svin.

Fedtsyre	Gåsefedt (vægt%)	Svinefedt (vægt%)
14:0	0,5	2
16:0	21	24
16:1(9)	2,5	4
18:0	6,5	14
18:1(9)	58	43
18:2(9,12)	9,5	9
18:3(9,12,15)	2	1
%Mættet	28	40
%Umættet	72	60

Det fremgår vist med al tydelighed, at det er graden af umættethed, der er på spil. Men jeg må indrømme, at det forekommer mig, at forskellene gennemgående er marginale. – Men nu skal grise jo også færdes ude om vinteren.

ThP

CO₂-fabrik ved Helsingfors

Mens atmosfæren har et overskud af CO₂, så var der faktisk mangel på CO₂ i det meste af Europa i den forgangne sommer. Men det skulle være slut nu, da AGA er blevet færdig med en ny CO₂-fabrik i Sköldvik, der ligger tæt ved den finske hovedstad Helsingfors.

Det er primært kunder omkring Østersøen, som den nye fabrik skal levere til. At fabrikken er blevet lagt i Sköldvik er langt fra nogen tilfældighed. Her ligger også et af nordens største raffinaderier, og da AGA's nyopførelse netop skal genbruge og rense gasrester, var stedet givet på forhånd.

Nyt om...

... jern lugter

De fleste har formentlig oplevet den mugne, metalliske lugt, der opstår, når man tager på en jernoverflade med en svedig hånd eller stør jernholdig gødning ud uden handsker.

Denne lugt har mystificeret kemikere i flere århundreder, for det var formentlig ikke jernet, der lugtede. Nu er problemet løst, idet nogle forskere ved Virginia State University mener, at lugten

skyldes 1-octen-3-on, der dannes sammen med C₆ til C₁₀ n-aldehyder i en redoxreaktion mellem jernet og peroxider fra polyumættede fedtsyrer i huden.

De påviste de dannede forbindelser med GC/MS-analyser. De samme forbindelser kunne påvises, når man smurte blod på huden, ligeledes Fe²⁺, men ikke Fe³⁺. De påviste endvidere, at en hvidløgssagtig lugt, iagttaget når støbejern blev behandlet med syre, skyldtes methylphosphan H₂PCH₃.

Carl Th.

The Two Odours of Iron when Touched or Pickled, *Angewandte Chemie International Edition* **45**, 2006 side 7006

