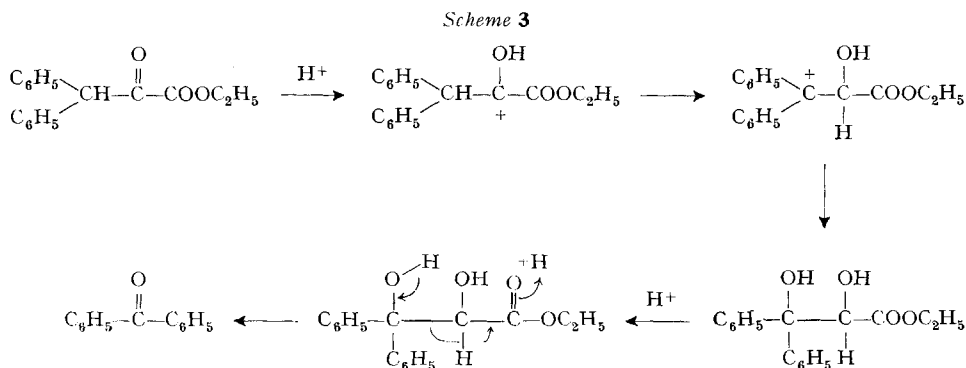


yielding benzophenone was observed, which is best explained by a retro-pinacol reaction as shown in Scheme 3.



The acid-catalyzed retro-aldol cleavage postulated in the last step has also been found to be a common feature in the chemistry of ethyl phenylglycerates [2].

A detailed mechanistic study of the above reactions will be performed with specifically labelled precursors.

J. K. is grateful to the Department of Organic Chemistry, University of Geneva, for its hospitality (1971-72).

BIBLIOGRAPHY

- [1] *S. P. Singh & J. Kagan*, *J. Amer. chem. Soc.* **91**, 6198 (1969).
- [2] *J. Kagan, D. A. Agdeppa, Jr. & S. P. Singh*, *Helv.* **55**, 2252 (1972).
- [3] *D. Bethel & V. Gold*, 'Carbonium Ions, An Introduction', Academic Press, New York N.Y., p. 217 (1967).

223. Über das Lipoxygenase-«Lipoperoxidase»-System in Cerealien: III. Zur Kinetik des enzymatischen Abbaues von Linolsäurehydroperoxiden¹⁾

von **W. Heimann, F. Reinartz** und **P. Schreier**

Institut für Lebensmittelchemie der Universität Karlsruhe

(10. VII. 72)

Zusammenfassung. Durch Untersuchung der Kinetik der Peroxidase-katalysierten Linolsäurehydroperoxid (LHP(O))-Abbaureaktion mit einem Hafer-Ammoniumsulfatpräparat wird gezeigt, dass es sich um eine bimolekulare Reaktion in zwei Ein-Elektron-Schritten des Peroxidase-Hydroperoxid-Komplexes mit dem Wasserstoffdonator handelt. Der Nachweis wird durch die Übereinstimmung der Versuchswerte mit einer aus der Theorie der binären Komplexbildung abgeleiteten mathematischen Funktion erbracht.

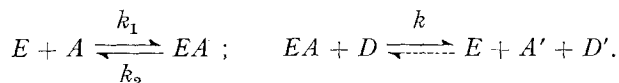
Nachdem wir durch die Untersuchungen von Enzym-Reaktionen [1] und der dabei gebildeten Umsetzungsprodukte [2] zeigen konnten, dass der Abbau von

¹⁾ II. Mitteilung: s. [1].

Linolsäurehydroperoxiden (LHPO) in Hafer durch eine Peroxidase katalysiert wird, haben wir nun den Mechanismus der Abbaureaktion durch den Nachweis klären können, dass die Reaktion übereinstimmend mit einer mathematischen Funktion verläuft, die wir aus der Theorie der binären Komplexbildung abgeleitet haben, aber nicht mit der auf Grund einer ternären Komplexbildung abgeleiteten Funktion.

Hierzu wurden die Vorstellungen von *Chance* [3] für die binäre Komplexbildung und die von *Wolf* [4] sowie *Mann* [5] für die ternäre Komplexbildung herangezogen.

Unter Anwendung der Symbole A = Wasserstoff-Akzeptor, D = Wasserstoff-Donator, E = freies Enzym, E_0 = Gesamtzym liegen nach *Chance* für einen binären Komplex EA folgende Gleichgewichte vor:



Unter der Voraussetzung, dass die Umwandlung des im Enzym-Substrat-Komplex gebundenen Substrats der langsamste und damit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Konstante k) und die Rückreaktion zwischen Enzym und den Endprodukten A' und D' vernachlässigbar ist (dargestellt als $\xrightarrow{\quad}$, verifizierbar durch Messung ausschliesslich der Anfangsgeschwindigkeit v_0), ergibt sich für $d(EA)/dt = 0$ als die Bedingung des stationären Zustandes:

$$k_1 \cdot (E_0 - EA) \cdot A - k_2 \cdot EA - k \cdot EA \cdot D = 0,$$

$$EA = \frac{E_0 \cdot A}{A + (k_2 + k \cdot D)/k_1}.$$

Für v_0 erhält man:

$$v_0 = \frac{k \cdot E_0 \cdot A \cdot D}{A + (k_2 + k \cdot D)/k_1}. \quad (\text{I})$$

Setzt man $A = D = x$, so folgt:

$$v_0 = - \frac{dx}{dt} = \frac{k \cdot E_0 \cdot x^2}{x + (k_2 + k \cdot x)/k_1}.$$

Diese Differentialgleichung hat die allgemeine Form:

$$- \frac{dx}{dt} = \frac{x^2}{b + c \cdot x},$$

wobei

$$b = \frac{k_2}{k_1 \cdot k \cdot E_0}; \quad c = \frac{1}{k \cdot E_0} + \frac{1}{k_1 \cdot E_0},$$

integriert:

$$b \cdot \ln \frac{x_0}{x} + c \cdot \left(\frac{1}{x} - \frac{1}{x_0} \right) = t,$$

x_0 = Anfangskonzentration von A und D .

Es ist also die Halbwertszeit $t_{1/2} = b \cdot \ln 2 + c/x_0$.

Mit x_0 multipliziert:

$$x_0 \cdot t_{1/2} = x_0 \cdot b \cdot \ln 2 + c. \quad (\text{II})$$

Trägt man in einem Diagramm $x_0 \cdot t_{1/2}$ gegen x_0 auf, so resultiert eine Gerade, die nicht durch den Nullpunkt geht.

Aus Gleichung (I) ergibt sich für die Michaelis-Konstante K_m und für v_{\max} :

$$K_m = \frac{k_2 + k \cdot D}{k_1} = \frac{k_2}{k_1} + \frac{k \cdot D}{k_1} \quad \text{bzw.} \quad v_{\max} = k \cdot E_0 \cdot D.$$

Zusammengefasst:
$$K_m = \frac{k_2}{k_1} + \frac{v_{\max}}{k_1 \cdot E_0}.$$

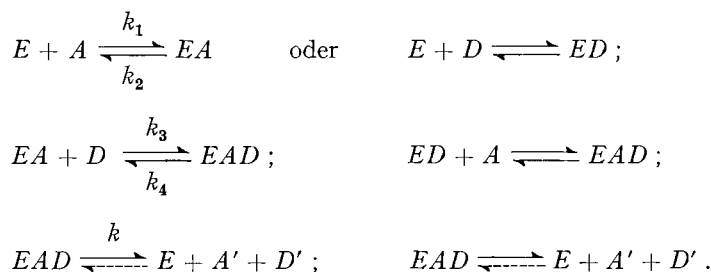
K_m und v_{\max} hängen also hier linear von der D -Konzentration ab.

Bei der Peroxidase und Katalase ist $(k \cdot D) > k_2$, daher weichen K_m und $K_1 = k_2/k_1$, die Dissoziationskonstante der Enzym-Substratverbindung EA , für höhere D -Konzentrationen erheblich voneinander ab. Hier gibt die Temperaturabhängigkeit von K_m keinen Aufschluss über die Bildungswärme von EA , wie dies bei Reaktionen mit nur einem Substrat der Fall ist, wo $k < k_2$. Jedoch lässt sich K_1 im K_m - v_{\max} - und im K_m - D -Diagramm ablesen, wenn man die Gerade bis zur Ordinatenachse verlängert. Ausserdem muss $k < k_1$ sein, damit der Zerfall von EA , wie angenommen, geschwindigkeitsbestimmend bleibt. Bestimmungen von einzelnen Geschwindigkeitskonstanten sind von Slater [6] und namentlich von Chance [3] ausgeführt worden, aber dieses Verfahren ist nicht generell anwendbar.

Die gleichen Überlegungen kann man für einen ternären Komplex EAD anstellen. Es gibt zwei Möglichkeiten:

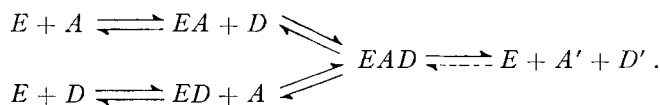
1. Die «Vorfahrt» der Substrate A und D ist streng geregelt (ordered addition):

Schema:



2. Die «Vorfahrt» bleibt dem Zufall überlassen (random addition):

Schema:



Beschränken wir uns auf den einfachen Fall einer geregelten Vorfahrt (die zufällige Vorfahrt ist komplizierter, führt aber zum gleichen Ergebnis), so lässt sich EAD aus den Dauerzustands-Bedingungen $dEA/dt = 0$ und $dEAD/dt = 0$ berechnen:

$$\begin{aligned} k_1 \cdot (E_0 - EA - EAD) \cdot A + k_4 \cdot EAD - k_2 \cdot EA - k_3 \cdot EA \cdot D &= 0; \\ k_3 \cdot EA \cdot D - k_4 \cdot EAD - k \cdot EAD &= 0. \end{aligned}$$

Aus den beiden Gleichungen ergibt sich:

$$EAD = \frac{k_1 \cdot E_0 \cdot A}{k_1 \cdot \frac{k_4 + k}{k_3} \cdot D \cdot A + k_1 \cdot A + k_2 \cdot \frac{k_4 + k}{k_3} \cdot D + k}$$

Nimmt man wieder an, der Zerfall dieses Komplexes bestimme die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion, so folgt:

$$v_0 = \frac{k \cdot E_0 \cdot A \cdot D}{\frac{k_4 + k}{k_3} \cdot A + A \cdot D + \frac{k_2}{k_1} \cdot \frac{k_4 + k}{k_3} + \frac{k}{k_1} \cdot D} \quad (\text{III})$$

Für $A = D = x$:

$$v_0 = \frac{dx}{dt} = \frac{k \cdot E_0 \cdot x^2}{\frac{k_4 + k}{k_3} \cdot x + x^2 + \frac{k_2}{k_1} \cdot \frac{k_4 + k}{k_3} + \frac{k}{k_1} \cdot x}$$

Diese Differentialgleichung ist von der allgemeinen Form:

$$-\frac{dx}{dt} = \frac{x^2}{a \cdot x^2 + b \cdot x + c},$$

wobei $a = \frac{1}{k \cdot E_0}$; $b = \left(\frac{k_4 + k}{k_3} + \frac{k}{k_1} \right) \cdot \frac{1}{k \cdot E_0}$; $c = \frac{k_2}{k_1} \cdot \frac{k_4 + k}{k_3} \cdot \frac{1}{k \cdot E_0}$.

Integriert:

$$a \cdot (x_0 - x) + b \cdot \ln \frac{x_0}{x} + c \cdot \left(\frac{1}{x} - \frac{1}{x_0} \right) = t \text{ mit } x_0 = \text{Anfangskonzentration von } A$$

und D .

Für die Halbwertszeit:

$$t_{1/2} = \frac{a}{2} \cdot x_0 + b \cdot \ln 2 + \frac{c}{x_0} \text{ und, mit } x_0 \text{ multipliziert:}$$

$$x_0 \cdot t_{1/2} = \frac{a}{2} \cdot x_0^2 + x_0 \cdot b \cdot \ln 2 + c. \quad (\text{IV})$$

Trägt man $x_0 \cdot t_{1/2}$ gegen x_0 auf, so resultiert eine *unsymmetrische Parabel, die nicht durch den Nullpunkt des Koordinatensystems geht*.

Die enzymatische LHPO-Abbaureaktion wurde mit einem durch Fällung mit Ammoniumsulfat isolierten Präparat aus Hafer mittels der bereits beschriebenen Methode mit *p*-Phenylendiamin-dihydrochlorid als H-Donator untersucht [1]. Nach Umrechnung der A/E -Min-Werte in $\mu\text{Mol/Min}$ -Umsatz wurden die jeweiligen Halbwertszeiten $t_{1/2}$ errechnet. Beim Eintragen von x_0 gegen $x_0 \cdot t_{1/2}$ in ein Diagramm ergab sich eine nicht durch den Nullpunkt gehende Gerade (Fig. 1 und Tab. 1).

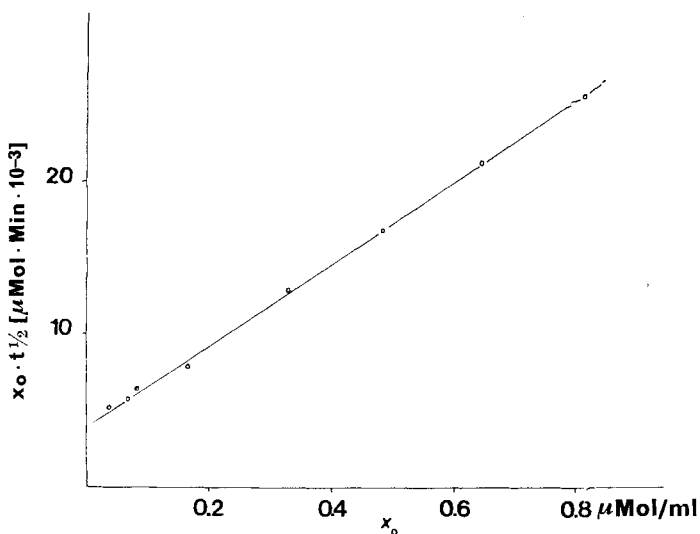


Fig. 1. Nachweis der binären Komplexbildung bei der enzymatischen LHPO-Abbaureaktion nach Gleichung (11)

Tabelle 1. Daten zum Nachweis des enzymatischen Reaktionsmechanismus

Anfangskonz. ($A = D = x_0$) [$\mu\text{Mol/ml}$]	Enzymaktivität [U/ml]	x_0 -50proz. Konz. [$\mu\text{Mol/ml}$]	$t_{1/2}$ [Min]	$x_0 \cdot t_{1/2}$ [$\mu\text{Mol/ml} \cdot \text{Min} \cdot 10^{-3}$]
0,032	0,10	0,0162	0,162	5,18
0,065	0,37	0,0325	0,088	5,67
0,081	0,50	0,0405	0,080	6,40
0,162	1,62	0,081	0,050	8,10
0,324	4,1	0,162	0,04	12,96
0,486	7,2	0,243	0,034	16,38
0,648	10,0	0,324	0,032	20,99
0,810	13,2	0,405	0,031	24,87

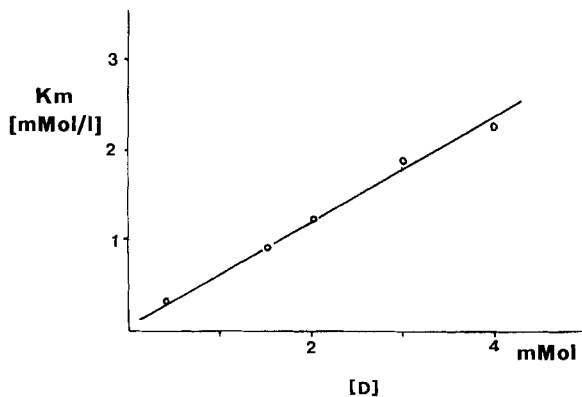


Fig. 2. Abhängigkeit der Michaelis-Konstante K_m von der Wasserstoff-Donator-Konzentration [D]

Zum gleichen Ergebnis kamen wir bei Einsatz von Peroxidase aus Meerrettich (Fa. *Boehringer*, Mannheim).

Hieraus folgt, dass die von uns untersuchten Peroxidase-katalysierten Abbaureaktionen entsprechend den Vorstellungen eines bimolekularen Reaktionsmechanismus [3] verlaufen. Ein weiterer Hinweis ist die lineare Abhängigkeit der *Michaelis*-Konstante vom Donator *D* (Fig. 2).

Aus zwei verschiedenen, mit Hilfe der Ausgleichsrechnung bestimmten K_m -Werten (vgl. Tab. 2) wurden berechnet:

$$k/k_1 = 0,527; \quad k_2/k_1 = K_1 = 1,1 \cdot 10^{-4}; \quad k_2/k = 2,1 \cdot 10^{-4}.$$

Tab. 2. Enzymaktivität in Abhängigkeit von der LHPO-Konzentration bei verschiedenen Donator-Konzentrationen

$$A: [D] = 4 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l}; \quad B: [D] = 4 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$$

Bestimmungsmethode: s. [1], Aktivitäten einheitlich auf 90 μg Protein/Versuchsvolumen bezogen.

A		B	
LHPO [Mol/l]	$\Delta E/\text{Min}$	LHPO [Mol/l]	$\Delta E/\text{Min}$
$0,85 \cdot 10^{-4}$	0,0255	$0,8 \cdot 10^{-4}$	0,027
$1,7 \cdot 10^{-4}$	0,044	$1,6 \cdot 10^{-4}$	0,053
$3,4 \cdot 10^{-4}$	0,065	$3,2 \cdot 10^{-4}$	0,096
$6,8 \cdot 10^{-4}$	0,083	$6,4 \cdot 10^{-4}$	0,172
$8,5 \cdot 10^{-4}$	0,088	$8,0 \cdot 10^{-4}$	0,200
$1,7 \cdot 10^{-3}$	0,100	$1,6 \cdot 10^{-3}$	0,330
$3,4 \cdot 10^{-3}$	0,111	$3,2 \cdot 10^{-3}$	0,500

Experimentelles. – Das Enzympräparat wurde wie in [1] beschrieben hergestellt.

Die enzymatischen Bestimmungen erfolgten im *Zeiss*-Spektralphotometer PMQ II mit *p*-Phenylendiamin-dihydrochlorid und LHPO [1], wobei die Konzentrationen für LHPO und dem Donator *D* gleich gross gewählt wurden ($A = D = x$). Die im Bereich von 0,032–0,81 $\mu\text{Mol/ml}$ erhaltenen $\Delta E/\text{Min}$ -Werte wurden in $\mu\text{Mol/Min}$ -Umsatz umgerechnet (Empfindlichkeit: 5,5 $\text{cm}^2/\mu\text{Mol}$; 1 *U* = die Enzymaktivität, die 1 $\mu\text{Mol/Min}$ umsetzt²⁾). Nach Errechnung der jeweiligen Halbwertszeiten (Tab. 1) wurde x_0 gegen $x_0 \cdot t_{1/2}$ in ein Diagramm eingetragen.

Der Firma *Knorr*, Heilbronn, danken wir für die Überlassung des Untersuchungsmaterials, dem *Forschungskreis der Ernährungsindustrie* und der *AIF* für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *P. Schreier & W. Heimann*, *Helv.* 54, 2803 (1971).
- [2] *W. Heimann & P. Schreier*, *Helv.* 53, 2296 (1970); 54, 2794 (1971).
- [3] *B. Chance*, *Adv. Enzymology* 12, 153 (1951); *J. biol. Chemistry* 141, 553 (1943); *Arch. Biochemistry* 22, 224 (1949); *Arch. Biochem. Biophysics* 41, 416 (1952).
- [4] *B. Woolf*, *Biochem. J.* 23, 472 (1929); 25, 342 (1931).
- [5] *P. J. G. Mann*, *Biochem. J.* 25, 918 (1931).
- [6] *E. C. Slater*, *Biochem. J.* 45, 14 (1949); 46, 484 (1950); 52, 185 (1952).

²⁾ Die Angabe in μMol Substratumsatz/Min ist nicht allgemeingültig, sondern nur für das angewandte Substrat zutreffend.