

- /6/ M. Rüschen, Klaas und S. Warwel: A three-step-one-pot chemo-enzymatic synthesis of epoxyalkanolacylates Synth. Commun., im Druck, voraus. 28, (2)...(1998)

Danksagung

Die Autoren danken dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (BML) und der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (Projekt: 93-NR064-F) für die finanzielle Unterstützung im Rahmen der Projektförderung.

Anschrift der Autoren:

Prof. Dr. S. Warwel, Dr. M. Rüschen, Klaas, Dipl.-Chem. G. Steinke
 Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung
 Institut für Biochemie und Technologie der Fette, H. P. Kaufmann-Institut
 Piusallee 68, 48147 Münster

Anwendung lipasekatalysierter Reaktionen bei der Herstellung spezieller cis- und trans-Octadecensäuren

R. Borgdorf, K. D. Mukherjee, S. Warwel
 Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung
 Institut für Biochemie und Technologie der Fette, Münster

1 Einleitung

Langkettige Monoenfettsäuren wie Ölsäure (*cis*-9-Octadecensäure) und Petroselinäure (*cis*-6-Octadecensäure) werden als Methylester durch Umesterung von Rapsöl oder ölsäurereichem Sonnenblumenöl bzw. von Korianderöl gewonnen; sie sind begehrte Ausgangsstoffe für oleochemische und technische Produkte.

Die Nutzung weiterer einfach ungesättigter C₁₈-Fettsäuren mit definierter Konfiguration und Position der C=C-Doppelbindung hängt entscheidend von ihrer Verfügbarkeit ab. Auf konventionellen Synthesewegen sind derartige Fettsäuren nur schwer zugänglich.

Durch Metathese ungesättigter Fettsäureester mit Olefinen gelingt jedoch die Bereitstellung von Octadecensäuren mit definierter Position der Doppelbindung im präparativen Maßstab [1]. Das Syntheseprinzip zum Aufbau des Kohlenstoffgerüsts ist in Abb. 1 am Beispiel der erfolgreich im Arbeitskreis durchgeführten Herstellung von Δ 13-Octadecensäuremethylester veranschaulicht [2].

Die Lage der Doppelbindung im Produkt wird durch den eingesetzten ungesättigten Fettsäureester vorgegeben, die Kettenlänge läßt sich durch die Wahl des Olefins gezielt modifizieren; allerdings fällt ein thermodynamisches Gleichgewichtsgemisch an (*trans/cis* = 80:20).

Zum Zwecke der *cis/trans*-Trennung wurden lipasekatalysierte Reaktionen herangezogen.

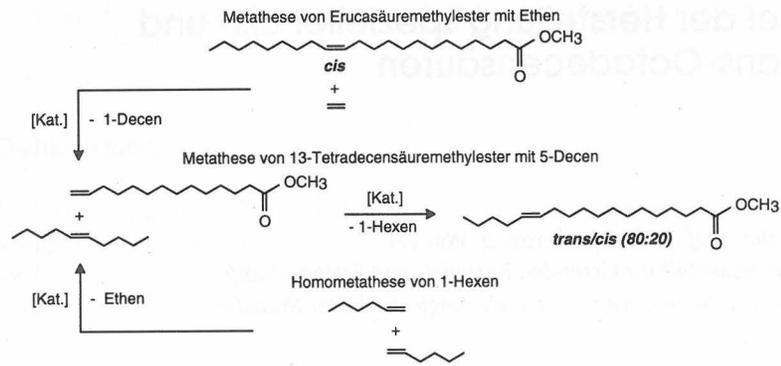


Abbildung 1: Synthesepinzip zur Herstellung spezieller Octadecensäuren mit Hilfe der Metathese-Reaktion am Beispiel von $\Delta 13$ -Octadecensäuremethylester

2 Verfahren und Methode

2.1 Verfahren

Die Stereospezifität und Substratspezifität von Triacylglycerin-Lipasen (EC. 3.1.1.3) eröffnen interessante Möglichkeiten zur Synthese und Modifizierung von Fetten und anderen Lipiden [3]. Zahlreiche Anwendungen lipasekatalysierter Reaktionen zur Gewinnung von speziellen Fettstoffen sind in den letzten Jahren bekannt geworden [4].

Ziel der eigenen Arbeiten ist es, die Spezifität von Lipasen gegenüber *cis*- und *trans*-Octadecensäuren zu bewerten und zur Trennung von *cis/trans*-Gemischen zu nutzen. Zu diesem Zwecke wurden in einem umfangreichen Enzym-Screening zahlreiche Lipasen aus Mikroorganismen und Pflanzen bei der Veresterung von Ölsäure (*cis*-9-Octadecensäure) bzw. Elaidinsäure (*trans*-9-Octadecensäure) mit *n*-Butanol untersucht.

2.2 Methode

In den Versuchen zur Bestimmung der Substratspezifität wird jeweils eine Fettsäure (25 mM) zusammen mit Myristinsäure (25 mM) als Referenzsubstrat und *n*-Butanol (100 mM) in 250 ml *n*-Hexan mit definierten mg-Mengen Lipase bei 30 °C für unterschiedliche Zeiten gerührt und der Biokatalysator anschließend mittels Zentrifugieren abgetrennt.

Die Reaktionsprodukte werden nach Eindampfen des Lösungsmittels mit einer Lösung von Diazomethan in Diethylether behandelt, um die nicht umgesetzten Fettsäuren in die Methylester zu überführen. Das resultierende Gemisch von Methylestern und Butylestern wird gaschromatographisch analysiert.

Aus den Konzentrationen der beiden Fettsäuresubstrate zu Beginn der Reaktion ($[A_{c1,X0}]$ und $[A_{c2,X0}]$) und nach einer bestimmten Reaktionszeit ($[A_{c1,X}]$ und $[A_{c2,X}]$) lässt sich nach der von Rangheard et al. beschriebenen Methode [5] der kompetitive Faktor α berechnen:

$$\alpha = \log([A_{c1,X0}]/[A_{c1,X}]) / \log([A_{c2,X0}]/[A_{c2,X}])$$

Die Spezifitätskonstante einer Fettsäure wird berechnet als $1/\alpha$, bezogen auf die Spezifitätskonstante von Myristinsäure, die den Wert 1,00 erhält.

Bei den im Enzymscreening untersuchten Lipasen handelt es sich um kommerziell erhältliche Produkte. Die verwendeten Fettsäuren weisen eine GC-Reinheit von $\geq 99\%$ auf und sind ebenfalls käuflich.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse des Enzymscreenings zeigt Abb. 2, in der das Verhältnis der Spezifitätskonstanten für Ölsäure und Elaidinsäure (\blacksquare *cis/trans*) von ausgewählten Lipasen als Maß für die Substratpräferenz dargestellt ist.

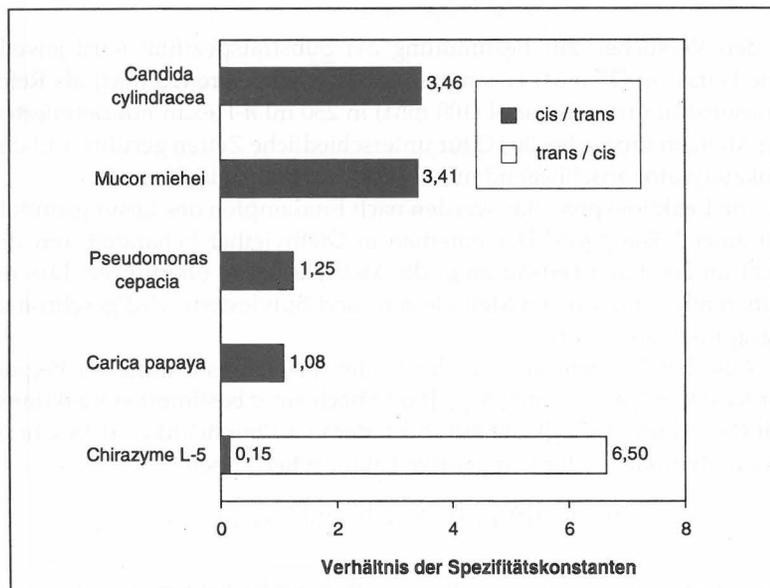


Abbildung 2: Verhältnis der Spezifitätskonstanten für Ölsäure und Elaidinsäure als Maß für die Substratpräferenz

Von den 35 untersuchten Biokatalysatoren erwiesen sich viele als unselektiv gegenüber den konfigurationsisomeren Δ^9 -Octadecensäuren; für sie wurde ein Quotient im Bereich von 1 berechnet (z. B. *Carica papaya* und *Pseudomonas cepacia*). Die Lipasen aus *Candida cylindracea* und *Mucor miehei* zeigen hingegen eine deutliche Präferenz für Ölsäure (Verhältnis=3,46 bzw. 3,41), während Chirazyme L-5, eine Lipase der Firma Boehringer Mannheim, als einziges der verwendeten Enzyme die Elaidinsäure in hohem Maße bevorzugt (Quotient = 0,15 bzw. 6,50).

Die von der Lipase aus *Candida cylindracea* katalysierte Umsetzung eines Elaidinsäure-Ölsäure-(80:20)-Gemisches mit *n*-Butanol führte innerhalb von 90 min zu einer vollständigen Veresterung der Ölsäure zum Butylester, der Umsatz der Elaidinsäure betrug zur gleichen Zeit 65 % [Abb. 3]. Das Resultat war folglich eine Anreicherung der Ölsäure in der Produktfraktion und eine aus reiner Elaidinsäure bestehende Eduktfraktion.

Das Studium der Substratspezifität ausgewählter Lipasen wird derzeit systematisch auf weitere *cis/trans*-Fettsäuren ausgedehnt.

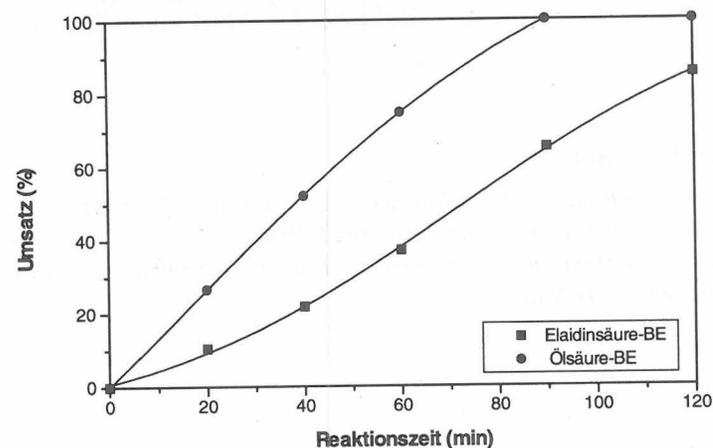


Abbildung 3: Veresterung von Elaidinsäure und Ölsäure (80:20-Gemisch) mit *n*-Butanol unter Verwendung der Lipase aus *Candida cylindracea*

Reaktionsbedingungen: (Methode siehe oben)
 Elaidinsäure (40 mM), Ölsäure (10 mM),
n-Butanol (100 mM) in 250 ml *n*-Hexan;
 Einwaage an Lipase: 20,2 mg

Literatur

- /1/ S. Warwel, P. Bavaj, B. Ercklentz, M. Harperscheid, M. Rüschen, Klaas und S. Thomas: Industriechemikalien durch Metathese und Oxidation ungesättigter Fettstoffe. In: „Nachwachsende Rohstoffe“ (Hrsg.: M. Eggensdorfer, S. Warwel, G. Wulff), VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1993, S. 69-95
- /2/ B. Ercklentz, Dissertation, RWTH Aachen, 1993
- /3/ K. D. Mukherjee: Lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. *Biocatalysis* 3, 277 (1990)
- /4/ K. D. Mukherjee: Fractionation of fatty acids and other lipids via lipase-catalyzed reactions. *Oléagineux Corps gras Lipides* 2, 365 (1995)

- /5/ M.-S. Rangheard, G. Langrand, C. Triantaphylides und J. Baratti: Multi-competitive enzymatic reactions in organic media: a simple test for the determination of lipase fatty acid specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 1004, 20 (1989)

Anschrift der Autoren:

Prof. Dr. S. Warwel, Dr. K. D. Mukherjee, Dipl.-Chem. R. Borgdorf
Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung
Institut für Biochemie und Technologie der Fette, H. P. Kaufmann-Institut
Piusallee 68, 48147 Münster

Einsatz pflanzlicher Epoxidhydrolasen zur stereoselektiven Synthese vicinaler Dihydroxyfettsäuren und ihrer Derivate

L. Heiss, S. Warwel
Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung
Institut für Biochemie und Technologie der Fette, Münster

1 Einleitung

Epoxidhydrolasen (EC 3.3.2.3) sind Biokatalysatoren, die aufgrund ihrer hohen Stereoselektivität für die Wirkstoffsynthese von großem Interesse sind. Hiermit steht eine Alternative zur katalytischen asymmetrischen *cis*-Dihydroxylierung von Olefinen zur Verfügung. Innenständige Oxiranringe in epoxidierten Fettsäuren lassen sich mit isolierten pflanzlichen Epoxidhydrolasen aus Soja-, Rizinus- und Futterwickekeimen [1, 2, 3] im Mikromaßstab effektiv umsetzen. Der Enzymmechanismus, der für racemische *cis*-9,10-Epoxystearinsäure als Substrat beobachtet wurde, zeigt, daß bevorzugt das S-konfigurierte C-Atom angegriffen wird. Diese Besonderheit führt dazu, daß ein einheitliches chirales Produkt aus dem racemischen Edukt gebildet wird [Abb. 1].

E. Blée et al. nutzten aus gekeimten Sojabohnen aufgereinigte Enzympräparate für Epoxidringöffnungen [4]. Dabei wurden die Cotyledonen der Keimlinge homogenisiert und in mehreren Stufen zentrifugiert. Nach einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und mehreren Chromatographieschritten, wurde eine aktive Enzymfraktion erhalten.