

- /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 Futterwickenkeimen [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.

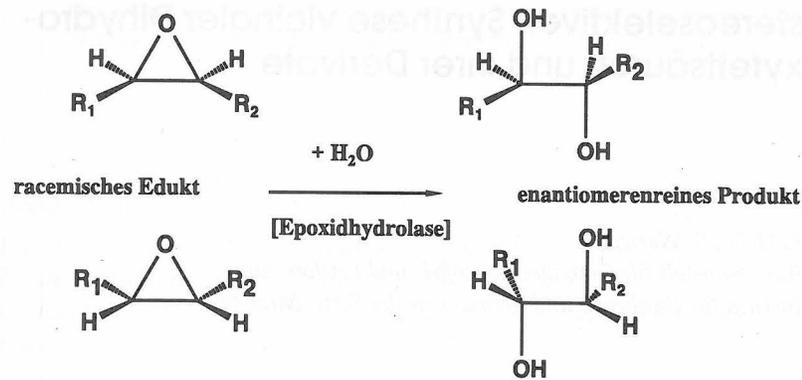


Abbildung 1: Mechanismus zur enzymatischen Epoxidringöffnung

2 Ergebnisse

Ein einfacherer Zugang zu aktiven Biokatalysatoren konnte hier durch den Einsatz von Acetonpulvern aus gekeimten und ungekeimten Sojabohnen gefunden werden. Dabei werden die Keimlinge bzw. ungekeimten Sojabohnen homogenisiert und mit kaltem Aceton werden mehrfach lösliche Begleitstoffe extrahiert. Der Extraktionsrückstand („Acetonpulver“) wird nach Entfernung des Lösungsmittels als Biokatalysator verwendet. In einer Vergleichsstudie (Tabelle 1) erwies sich das Acetonpulver aus ungekeimten Sojabohnen als besonders aktiv. Weiterhin wurde die Substratkonzentration von ca. 30 mg/l auf bis zu 10 g/l gesteigert.

In einem Modellversuch wurden 35 mg racemischer cis-9,10-Epoxy-stearinsäuremethylester mit 50 mg Acetonpulver aus ungekeimten Sojabohnen umgesetzt. Nach 6 Tagen Reaktionszeit wurde ein Umsatz von > 90 % beobachtet, wobei das Reaktionsprodukt einen ee-Wert von > 95 % [Abb. 2] aufwies.

Tabelle 1: Epoxid-Ringöffnung von 9,10-Epoxy-stearinsäuremethylester unter Katalyse von Epoxidhydrrolasen aus Sojabohnen (Acetonpulver)

Acetonpulver (unterschiedlicher Herkunft)	Ausbeute 9,10-Dihydroxystearinsäuremethylester
ungekeimte Sojabohne	65 %
gekeimte Sojabohne (ganzer Keimling)	40 %
gekeimte Sojabohne (nur Cotyledon)	25 %
gekeimte Sojabohne ^{a)} (nur Keim)	2 %
ungekeimte Sojabohne (SIGMA)	55 %

Bedingungen: Raumtemperatur, 3 Tage Reaktionszeit
 Ansatz: 100 mg 9,10-Epoxy-stearinsäuremethylester, 10 ml Phosphat-Puffer,
 50 mg Acetonpulver,
 a) hier 30 mg Acetonpulver

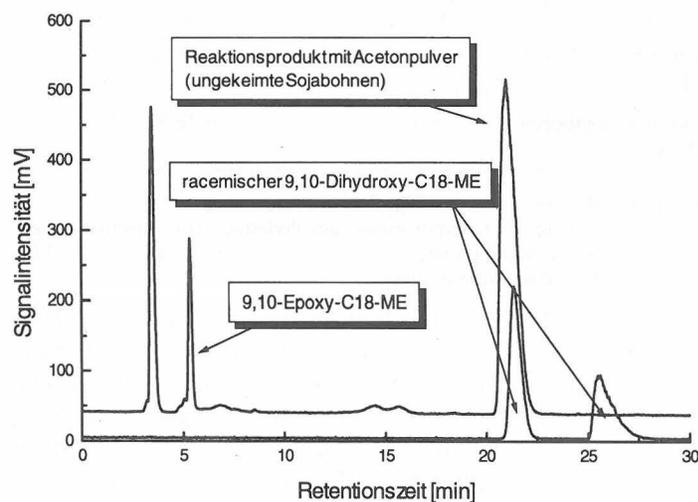
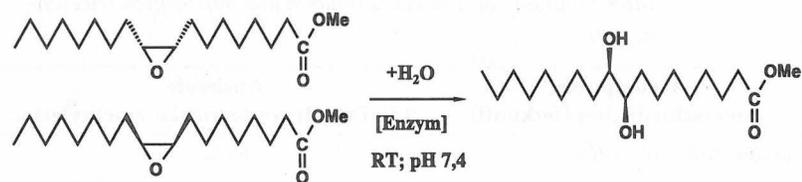
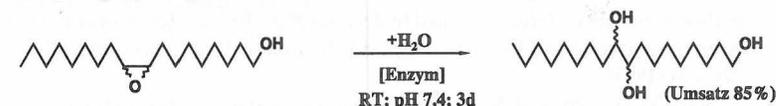


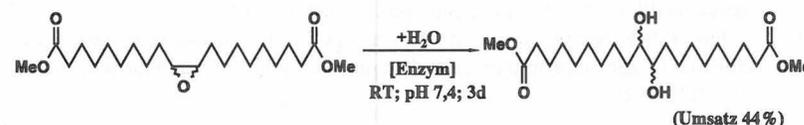
Abbildung 2: HPLC-Chromatogramm von 9,10-Dihydroxystearinsäuremethylester auf einer Chiralcel OD-Säule (Flow 1 ml/min; *n*-Hexan:2-Propanol (97,5 : 2,5), ELS-Detektor)

Es stehen zahlreiche weitere Substrate für die Epoxid-Ringöffnungen unter Katalyse von Epoxidhydrasen zur Verfügung. Einerseits bietet der naturalpool epoxidierte Fettsäuren an (z. B. Vernolsäure). Weiterhin lassen sich natürlich vorkommende Fettsäuren epoxidieren und durch die Metathesereaktion von Fettsäuremethylestern lassen sich unnatürliche ungesättigte Fettsäuren als Edukte für die Epoxidation synthetisieren. Mit den folgenden Substraten wurden erste Syntheserfolge erzielt. Die Stereochemie der Reaktionsprodukte ist bisher nicht aufgeklärt.

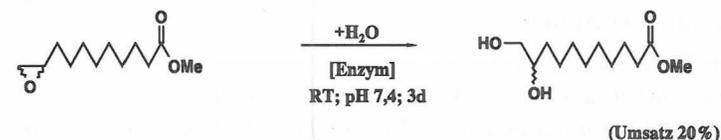
cis-9,10-Epoxystearylalkohol



trans-10,11-Epoxyeicosandicarbonsäuredimethylester



10,11-Epoxyundecansäuremethylester



3 Ausblick

Durch die Gewinnung von Acetonpulvern aus gekeimten oder ungekeimten Pflanzensamen stehen Biokatalysatoren ohne aufwendige Aufreinigung zur Verfügung. Unser Ziel ist es, ein Screening weiterer Pflanzensamen durchzuführen, um so neue Biokatalysatoren zu erhalten, die sich möglicherweise in Aktivität und Selektivität unterscheiden. Die Reaktionsbedingungen, insbesondere der Einsatz organischer Cosolventien oder anderer Zusätze werden intensiv untersucht. Ziel ist es weiterhin durch Immobilisierung den Katalysator in seiner Aktivität und Stabilität zu optimieren. Schließlich werden zahlreiche natürliche und synthetische Substrate untersucht, die von hohem synthetischen Nutzen für Folgereaktionen sind.

Literatur

- /1/ E. Blée, F. Schuber: Stereocontrolled hydrolysis of the linoleic acid monoepoxide regioisomers catalyzed by soybean epoxide hydrolase. *Eur. J. Biochem.* 230, 229–234 (1995)
- /2/ A. Stark, H. Houshmand, M. Sandberg, J. Meijer: Characterization of the activity of fatty acid epoxide hydrolase in seeds of castor bean (*Ricinus communis* L.). *Planta* 197, 84–88 (1995)
- /3/ F. Pinot, H. Bosch, J.-P. Salaün, F. Durst, C. Mioskowski, B. D. Hammock: Epoxide hydrolase activities in the microsomes and the soluble fraction from *Vicia sativa* seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 35, 103–110 (1997)
- /4/ E. Blée, F. Schuber: Occurrence of fatty acid epoxide hydrolases in soybean (*Glycine max*) Purification and characterization of the soluble form. *Biochem. J.* 282, 711–714 (1992)

Anschrift der Autoren:

Prof. Dr. S. Warwel, Dr. L. Heiss
Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung
Institut für Biochemie und Technologie der Fette, H. P. Kaufmann-Institut
Piusallee 68, 48147 Münster

Zur Kinetik der chemo-enzymatischen Epoxidation ungesättigter Fettsäuren

M. Wiebe, I. Hilker, H.-J. Warnecke ¹⁾, J. Prüß ²⁾
M. Rüschen, Klaas, B. Wiege, S. Warwel ³⁾
1) FB 13 Technische Chemie und Chemische Verfahrenstechnik
Universität-Gesamthochschule Paderborn
2) Institut für Analysis
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3) Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung
Institut für Biochemie und Technologie der Fette, Münster

1 Problemstellung

Für den Einsatz in der chemischen Industrie müssen nachwachsende Rohstoffe modifiziert werden. Bei Fetten und Ölen bieten sich neben der Carboxylgruppe die C=C-Doppelbindungen an, die in einer Prileschajew-Reaktion epoxidiert werden können. Als Sauerstoffüberträger wird allgemein eine organische Persäure, meist Peressigsäure eingesetzt.

Eine Alternative stellt die chemo-enzymatische Epoxidation direkt mit Wasserstoffperoxid und einer immobilisierten Lipase der *Candida antarctica* dar, wobei als epoxidierende Komponente die durch Enzymreaktion gewonnene Perettsäure fungiert [1, 2].

Für dieses komplexe Reaktionssystem liegen bislang nur wenige reaktionstechnische Daten vor. Zur Aufschlüsselung der Kinetik müssen die aufeinander folgenden Reaktionen getrennt untersucht werden. Der Einsatz einer gesättigten Fettsäure wie Stearinsäure (18:0) ermöglicht die Beobachtung der Enzymreaktion, wobei die so gewonnene stabile Perstea-