

Enantioselektive Biokatalyse in organischen Solventien am Beispiel Lipase-katalysierter Reaktionen

Von Ching-Shih Chen* und Charles J. Sih*

Neue synthetische Methoden (76)

Die enantioselektive Biokatalyse in nicht-wässrigen Medien gewinnt in der präparativen Chemie zunehmend an Bedeutung. Dieser Beitrag beschreibt a) die generellen katalytischen Eigenschaften von Enzymen in nicht-wässriger Umgebung, b) die grundlegenden Prinzipien der Herstellung optisch aktiver Carbonsäuren und Alkohole durch Lipase-katalysierte enantioselektive Veresterungen und Umesterungen in organischen Medien, c) die Bestimmung kinetischer und thermodynamischer Parameter und d) die quantitative Analyse von veröffentlichten Daten.

1. Einleitung

Nach allgemeiner Ansicht ist eine wässrige Umgebung optimal, um die für Bindung und Katalyse maßgeblichen Konformationen eines Enzyms aufrecht zu erhalten. Deshalb werden enzymatische Reaktionen generell in wässrigen Medien ausgeführt. In einem wässrigen System wird die Faltung eines löslichen Proteins von der Neigung der hydrophoben Aminosäurereste bestimmt, den Kontakt mit Wasser zu vermeiden. Während sie sich im Inneren des Moleküls verborgen, treten geladene und hydrophile Reste an der Oberfläche in Kontakt mit dem wässrigen Lösungsmittel. Wird Wasser nun durch ein unpolares Lösungsmittel ersetzt, beginnt eine Dispersion der hydrophoben Reste im Inneren, als deren Folge sich die Tertiärstruktur des Enzyms neu organisiert. Die Konformation des Proteins muß sich dabei drastisch ändern; im Extremfall kann man die Enzymtasche in organischen Medien als „umgestülpt“ betrachten^[1]. Folglich muß man erwarten, daß nun die katalytischen Eigenschaften des Enzyms schlechter als in Wasser sind. Diese naheliegende Vorstellung hat vielleicht früher die Erforschung der stereo-selektiven Eigenschaften von Enzymen in nicht-wässrigen Medien verhindert. In den letzten Jahren ist jedoch zunehmend deutlich geworden, daß viele biokatalysierte Reaktionen in nicht-wässriger Umgebung mit hoher Enantioselektivität verlaufen können.

Seit längerer Zeit ist bekannt, daß eine Vielzahl von Enzymen in unpolaren Medien katalytisch aktiv ist (Tabelle 1). Einige dieser Enzyme sind auch für Umsetzungen von wasserlöslichen Substraten^[2] (z. B. die Umesterung von Fetten) und, unter Umkehrung der Hydrolyse, für Peptidsynthesen^[2-6] eingesetzt worden. Dennoch haben erst die für die Synthese wertvollen, enantioselektiven Eigenschaften der Lipasen^[2-20] (Triglycerol-Acylhydrolasen, EC 3.1.1.3) die Aufmerksamkeit der präparativ arbeitenden Organiker erregt. Lipasen, die eine einzigartige Stabilität in unpolaren organischen Lösungsmitteln zeigen, können eine Vielzahl von Konformationen annehmen und sich somit Substraten unterschiedlicher Größe und stereochemischer Komplexität anpassen. Darüber hinaus konnten Verbindungen, die in

Wasser instabil sind (Anhydride, halogenierte Verbindungen etc.), als Substrate eingesetzt werden. Noch wichtiger aber ist, daß Lipase-katalysierte Veresterungen in organischen Lösungsmitteln oftmals eine höhere Enantioselektivität als die entsprechenden Hydrolysen in Wasser zeigen. Deshalb gewinnt diese „nicht-wässrige“ Technik der Biokatalyse als Methode zur Herstellung optisch aktiver Verbindungen zunehmend an Bedeutung. Dieser Beitrag möchte präparativ

Tabelle 1. Repräsentative Beispiele für enzymatisch katalysierte Umsetzungen in organischen Medien.

Biotkatalysator	Lösungsmittel	Katalysierte Reaktion	Lit.
Lipasen (ungereinigtes Pulver)	Unpolare Lösungsmittel	Veresterung, Umesterung Peptidsynthese Bildung makrocyclischer Lactone	[2-20] [21, 22] [23-25]
Proteasen (Thermolysin, Subtilisin, Chymotrypsin)	Ethylacetat, Amylalkohol etc.	Peptidsynthese	[26]
Immobilisierte Carboxyesterase	Methylpropionat	Enantioselektive Acylierung racemischer Alkohole	[2, 9]
Immobilisierte Alkohol-Dehydrogenase	Isopropylalkohol	Asymmetrische Reduktion von Ketonen	[27]
Immobilisierte Polyphenol-Oxidase	Chloroform	Oxidative Umwandlung von Phenolen in o-Chinone	[28]
Immobilisierte Mandelonitrilase	Ethylacetat	Synthese optisch aktiver (R)-Cyanhydrate	[29]
Cholesterin-Oxidase	Heptan, CCl ₄ , Butylacetat	Oxidation von 3β-Hydroxy-steroiden	[30]

arbeitende Chemiker durch eine Diskussion der grundlegenden Prinzipien und neuerer Arbeiten für diese Methodik interessieren. Behandelt werden hier ausschließlich die enantioselektiven Eigenschaften der Lipasen in organischen Medien; neuere Entwicklungen zur enzymatischen Katalyse in inversen Micellen^[31] und überkritischen Flüssigkeiten^[32] wurden nicht berücksichtigt. Zur Enzymologie und zur Kinetik Lipase-katalysierter Reaktionen sei auf andere Publikationen verwiesen^[33].

[*] Prof. Dr. C. S. Chen
College of Pharmacy, University of Rhode Island
Kingston, RI 02881-0809 (USA)
Prof. Dr. C. J. Sih
School of Pharmacy, University of Wisconsin
Madison, WI 53706 (USA)

2. Enzymatische Katalyse in organischen Lösungsmitteln – allgemeine Bemerkungen

Für biokatalysierte Umsetzungen werden drei Arten von Lösungsmittelsystemen benutzt: a) Ein System aus Wasser und einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel, b) ein wasserfreies (< 1 % Wasser) organisches Lösungsmittel und c) ein zweiphasiges System aus Wasser und einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel. Die potentiellen Vorteile beim Ausführen biokatalysierter Reaktionen in diesen Lösungsmittelsystemen wurden mehrfach zusammengefaßt^[34–38]: a) Mit schlecht wasserlöslichen Substraten kann eine effiziente Katalyse erzielt werden, b) durch hydrolysierende Enzyme katalysierte Reaktionen können in Richtung Synthese gelenkt werden, c) unerwünschte Nebenreaktionen in organischen Medien sowie Substrat- und Produktinhibition können verringert werden, d) die Gewinnung des Produktes und die Abtrennung des Biokatalysators aus dem Reaktionsmedium kann vereinfacht sein und e) die Enzyme können in wasserfreien organischen Medien stabiler sein.

Um die Löslichkeit schlecht wasserlöslicher Substrate zu verbessern, werden den wäßrigen Reaktionsmedien oftmals mit Wasser mischbare organische Cosolventien wie Aceton, Methanol, Ethanol, Dimethylformamid (DMF) und Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt^[38]. Darüber hinaus sind Lösungsmittel in der Peptidsynthese häufig zum Verschieben des Ionengleichgewichts eingesetzt worden. Durch Verkleinerung der Dielektrizitätskonstante des Mediums verringert das organische Cosolvens die Hydratisierung ionischer Gruppen und setzt dadurch die Acidität der Carboxygruppe und die Basizität der α -Aminogruppe herab^[39]. Während jedoch niedrige Konzentrationen dieser polaren Lösungsmittel oft keine schwerwiegenden Nachteile haben (DMSO-Konzentrationen bis zu 20 % wurden in Lipase-katalysierten, enantioselektiven Esterhydrolysen angewendet^[40]), führen höhere Lösungsmittelkonzentrationen zunehmend zur Denaturierung der Proteine und damit zu einem Verlust an Stereospezifität. Die Verwendung angemessener Mengen polarer Cosolventien kann die Reaktion beschleunigen und in einigen Fällen auch die Stereoselektivität biokatalytisch wirksamer Systeme erhöhen^[41–43]. Dieser Beitrag wird sich jedoch ausschließlich auf die Biokatalyse in zweiphasigen Systemen aus wäßrigen und mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln sowie in wasserfreien organischen Lösungsmitteln konzentrieren. Von besonderem Interesse sind dabei Lipase-katalysierte Veresterungen und Umlesterungen in organischen Lösungsmitteln, denn die Enantioselektivität von Kondensationsreaktionen in organischen Medien ist oftmals höher als bei den entsprechenden Hydrolysen in Wasser^[10, 18].

Es ist wohlbekannt, daß Lipasen sowohl in wäßrigen als auch in unpolaren Medien eine breite Palette auch synthetischer Substrate unterschiedlicher Größe akzeptieren können. Dies deutet darauf hin, daß die Proteinkette der Lipasen flexibel ist und eine Vielzahl von Konformationen annehmen kann, um Substrate aufzunehmen. Demzufolge müssen Lipasen niedrige Energiebarrieren für Konformationsumwandlungen des Enzymproteins haben – ein Verhalten, das Enzyme vom „induced-fit“-Typ erinnert^[44]. Diese Eigenheiten machen die Vorhersage der stereochemischen Wechselwirkung der Enzyme mit den Substraten schwierig.

So ist in einigen Fällen die Enantioselektivität bei Esterhydrolysen in Wasser höher als bei den zugehörigen Veresterrungsreaktionen und umgekehrt. Verlaufen Hydrolysen im wäßrigen Milieu jedoch mit schlechterer Enantioselektivität, so sollte die entsprechende Veresterung in einem organischen Lösungsmittel untersucht werden. Im Gegensatz dazu erwartet man für Enzyme vom „non-induced-fit“-Typ, die starrere Konformationen haben (höhere Energiebarrieren für die Überwindung nicht-kovalenter Kräfte), daß sie keine größeren Konformationsänderungen eingehen müssen, um in nicht-wäßrigen Umgebungen die katalytisch aktive Konformation anzunehmen. Da bei dieser Klasse von Enzymen die katalysierende Enzymtasche in nicht-wäßrigen Medien erhalten bleiben dürfte, ist zu erwarten, daß sie nur wenig ihrer katalytischen Aktivität und Enantioselektivität verlieren, wenn Wasser durch unpolare Medien ersetzt wird. Jedoch haben diese Enzyme üblicherweise eine ausgeprägte Substratspezifität, und eine Erhöhung der Enantioselektivität in unpolaren Medien ist unwahrscheinlich.

Kieboom^[45] hat sich näher mit den thermodynamischen Änderungen während der Komplexierung eines Substrats durch ein Enzym (Bildung eines EnzSu-Komplexes) befaßt. In wäßrigen Lösungen bilden die polaren Gruppen im katalytischen Zentrum des Enzyms und im Substrat Wasserstoffbrücken mit Wassermolekülen. Während der Komplexbildung werden einige der Wasserstoffbrückenbindungen geöffnet, und die dafür notwendige Energie verändert auch die freie Energie der Komplexbildung ($\Delta G_{\text{aq.}}$) (Abb. 1). Wenn

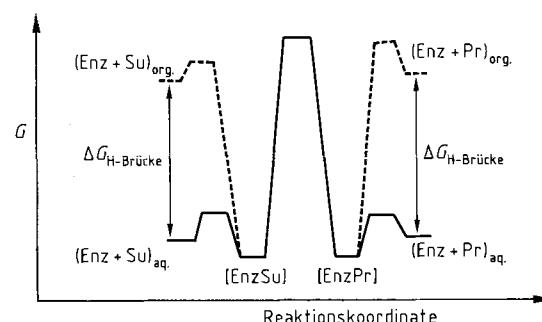


Abb. 1. Vergleich der in wäßriger Lösung und in organischen Lösungsmitteln durchlaufenden Freien-Energie-Profilen einer enzymatischen Reaktion, in der Substrat und Produkt Wasserstoffbrücken mit Wasser bilden. Enz = Enzym, Su = Substrat, Pr = Produkt, H-Brücke = Wasserstoffbrücke.

ein Lösungsmittel dagegen keine Wasserstoffbrücken bilden kann, werden bei der Entstehung des EnzSu-Komplexes keine Wasserstoffbrückenbindungen geöffnet, und die freie Energie der Komplexbildung^[45] ($\Delta G_{\text{org.}}$) läßt sich durch Gleichung (1) ausdrücken.

$$\Delta G_{\text{org.}} = \Delta G_{\text{aq.}} - (n_{\text{Enz}} + n_{\text{Su}}) \Delta G_{\text{H-Brücke}} \quad (1)$$

Dabei bezeichnen n_{Enz} und n_{Su} die Anzahl der zu spaltenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wassermolekülen und den aktiven Zentren des Enzyms bzw. des Substrats. Demzufolge kann der Zusammenhang zwischen den scheinbaren Assoziationskonstanten des Enzym-Substrat-Komplexes in Wasser ($K_{\text{a(aq.)}}$) und in organischen Lösungsmitteln ($K_{\text{a(org.)}}$) durch Gleichung (2) ausgedrückt werden.

$$K_{\text{a(aq.)}} = \exp [-(n_{\text{Su}} + n_{\text{Enz}}) \Delta G_{\text{H-Brücke}} / RT] \cdot K_{\text{a(org.)}} \quad (2)$$

$K_a = [EnzSu]/[Enz][Su]$. Der Übergang von der wäßrigen zur unpolaren Umgebung kann für stark polare Substratmoleküle (z. B. Polyhydroxyverbindungen oder ihre Phosphat-Derivate) zu einer sehr großen scheinbaren Assoziationskonstante für den Enzym-Substrat- und/oder den Enzym-Produkt-Komplex führen (Tabelle 2), obwohl die Bindungsenergie der Wasserstoffbrücken relativ klein ist ($4.5 \text{ kcal mol}^{-1}$). Als Konsequenz wird starke Substrat- und/oder Produkt-Inhibition auftreten.

Tabelle 2. Auswirkungen der Bindungsenergie von Wasserstoffbrücken auf die Enzym-Substrat-Komplexierung in unpolaren (organischen) Lösungsmitteln, berechnet für Lösungsmittel, die keine Wasserstoffbrücken bilden (z. B. Isooctan, Cyclohexan, Toluol) als organisches Solvens.

Anzahl der H-Brücken (n _{Enz} + n _{Su})	$K_{a(\text{org.})}/K_{a(\text{aq.})}$
1	2000
2	3.9×10^6
3	7.7×10^9
4	1.5×10^{13}

3. Lipasen und die Katalyse an Grenzflächen

Zur Zeit sind ca. zwanzig Lipasen mikrobiellen, pflanzlichen und tierischen Ursprungs im Handel (Tabelle 3). Viele dieser Lipasen wurden bis zur Homogenität gereinigt und kristallin erhalten, doch wurden nur die Kristalle der Lipase aus *Geotrichum candidum* durch Röntgenstrukturanalyse bei 6 \AA ^[46] und 2.8 \AA ^[47] Auflösung untersucht. Dabei fand

Tabelle 3. Herkunft kommerziell erhältlicher Lipase-Präparationen.

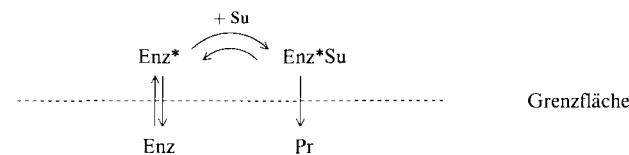
Herkunft	Hersteller
<i>Alcaligenes</i> -Arten	Amano
<i>Achromobacter</i> -Arten	Meito Sangyo
<i>Aspergillus niger</i>	Amano
<i>Bacillus subtilis</i>	Towa Koso
<i>Candida cylindracea</i>	Sigma, Amano, Meito Sangyo, Boehringer-Mannheim
<i>Candida lipolytica</i>	Amano
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Sigma, Toyo Jozo
<i>Geotrichum candidum</i>	Sigma, Amano
<i>Humicola lanuginosa</i>	Amano
<i>Mucor miehei</i>	Amano, NOVO
<i>Penicillium camemberti</i>	Rhône-Poulenc
<i>Phycomyces nitens</i>	Takeda Yakuhin
Schweinepankreas	Sigma, Amano, Boehringer-Mannheim
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amano
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano
<i>Pseudomonas</i> -Arten	Sigma, Boehringer-Mannheim
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Sigma, Boehringer-Mannheim
<i>Rhizopus delemar</i>	Sigma, Amano, Tanabe seiyaku
<i>Rhizopus japonicus</i>	Amano, Nagase Sangyo, Osaka Saiken Lab.
<i>Rhizopus oryzae</i>	Amano
<i>Rhizopus</i> -Arten	Amano, Serva
Weizenkeime	Sigma

man, daß das Enzym neun α -Helices und vier β -Stränge bildet. Der Gehalt an Helices wurde zu etwa 20 % berechnet. Das Molekül ist ellipsoid und weist Dimensionen von $50 \times 50 \times 70 \text{ \AA}^3$ auf. In der Nähe des Molekülzentrums befindet sich eine große Spalte, die vermutlich das aktive Zentrum des Enzyms bildet.

Über den Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkungsweise der Lipasen gibt es nur wenige Arbeiten. Für die

Aktivität der Lipase aus Pankreas sind Serin, Carboxylat und Histidin essentiell^[48]; bei der Lipase aus *Geotrichum candidum* scheint aber kein Serin beteiligt zu sein. Die Aktivität der Lipase aus *Humicola lanuginosa* hängt dagegen von Carboxylat, Histidin und Tyrosin ab^[49].

Lipase-vermittelte Katalysen haben ein gemeinsames Kennzeichen – in den katalytischen Prozeß ist eine Lipid-Wasser-Grenzfläche einbezogen^[33]. Diese einzigartige Fähigkeit, an Grenzflächen katalytisch aktiv zu sein, verleiht den Lipasen eine natürliche Affinität für hydrophobe Medien; sie unterscheiden sich dadurch von anderen hydrolytisch wirkenden Enzymen. Die generellen Prinzipien der enzymatischen Katalyse an Grenzflächen wurden von Verger et al. formuliert^[50] und können durch Schema 1 veranschaulicht werden.

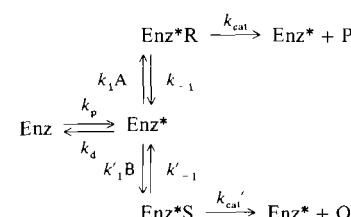


Schema 1.

Enz bezeichnet hierbei das Enzym in Lösung, Enz* das in die Grenzfläche eingedrungene Enzym, Su die Lipid-Substrate an der Phasengrenze und Pr die Reaktionsprodukte.

Dieses Modell umfaßt zwei aufeinanderfolgende Gleichgewichtsschritte. Zunächst wird das Enzym im Penetrationsschritt reversibel an die Phasengrenzfläche gebunden und nimmt dabei eine neue Konformation (Enz*) an. Im zweiten Schritt bildet das in die Grenzfläche eingedrungene Enzym Enz* mit dem Substrat Su den Komplex Enz*Su, aus dem nach der Katalyse die Produkte und Enz* freigesetzt werden.

Mit diesem Konzept kann die Lipolyse zweier unlöslicher, um das Enzym konkurrierender Enantiomere^[51] A und B nach Schema 2 beschrieben werden.



Schema 2.

Dabei wird angenommen, daß der eigentlich katalysierte Schritt irreversibel ist, was für das Anfangsstadium der Reaktion sicher zutrifft. Dieses Konzept unterscheidet sich vom konventionellen Enzymmodell^[52] für miteinander um ein Enzym konkurrierende Substrate nur durch das zusätzliche Gleichgewicht zwischen Enz und Enz* und ähnelt dem von Fersht^[53] vorgeschlagenen Modell für das „induced-fit“-Phänomen. Da die Enantiomere gleiche oberflächenaktive Eigenschaften haben, ist das Verhältnis k_d/k_p eine Konstante und von der relativen Konzentration der Enantiomere an der Grenzfläche unabhängig. (k_p beschreibt die Penetration in die Grenzfläche, k_d die Rückdiffusion in die wäßrige Phase.) Folglich trägt der Penetrationsschritt nichts zum Diskrimi-

nierungsvorgang bei^[44], und für die Enantioselektivität *irreversibler* Lipase-katalysierter Reaktionen in mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmitteln oder in wasserfreien organischen Medien gilt die klassische Gleichung für homokompetitive Umsetzungen [Gl. (3)]. k_{cat}/K_m bezeichnet die scheinbare Gleichgewichtskonstante für die Reaktion zweiter Ordnung des Enzyms mit dem Substrat zum Produkt oder zu den Produkten bei infinitesimal kleiner Substratkonzentration. k_{cat} und K_m repräsentieren die Katalysekonstante und die Michaelis-Konstante, E ist die Enantioselektivität^[52].

$$\frac{\ln([A]/[A]_0)}{\ln([B]/[B]_0)} = E = \frac{(k_{\text{cat}}/K_m)_A}{(k_{\text{cat}}/K_m)_B} \quad (3)$$

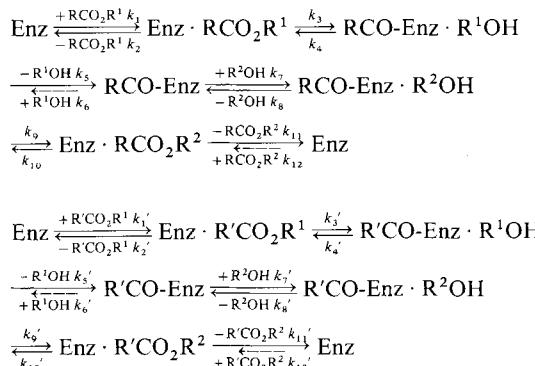
Dieser Zusammenhang wurde durch Ableitung aus den Beziehungen für die Kinetik im stationären Zustand bestätigt. Ferner lassen sich die für Phospholipase^[50] und Lipase^[51] erhaltenen kinetischen Daten mit diesem Modell hingänglich gut wiedergeben.

4. Stereospezifität der Lipase-Katalyse in organischen Lösungsmitteln

In organischen Lösungsmitteln katalysieren Lipasen die Übertragung von Acylgruppen von geeigneten Donoren auf eine Vielzahl von Aczeptoren. In Abhängigkeit von der Art der Acyldonoren und -acceptoren können die Lipasen Veresterungen, Umesterungen, Amidierungen, Peptidsynthesen und den Aufbau von makrocyclischen Lactonen katalysieren. Hiervon interessieren besonders die enantioselektiven Um- und Veresterungen, denn sie eröffnen dem präparativ arbeitenden Chemiker einen einfachen Zugang zu optisch aktiven Carbonsäuren und Alkoholen. Vom mechanistischen Standpunkt aus gesehen haben die enzymatischen Um- und Veresterungen vieles mit den entsprechenden Hydrolysen gemeinsam; die grundlegenden Prinzipien, die die Stereospezifität bestimmen, sind jedoch etwas unterschiedlich und bedürfen einer genaueren Betrachtung.

4.1. Racematspaltung von Carbonsäuren durch enantioselektive Estersynthese

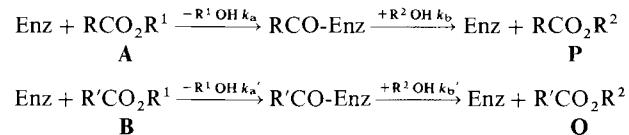
Die Kinetik des Lipase-katalysierten Acyltransfers in organischen Medien kann durch einen Ping-Pong-Mechanismus^[54], der in Schema 3 dargestellt ist, beschrieben werden.



Schema 3.

Für $R^2 = H$ sind die Mechanismen für die Synthese und die Hydrolyse analog. Die Um- und Veresterung wird jedoch durch die Reversibilität der enzymatischen Katalyse zusätzlich kompliziert, wenn ein Acylacceptor R^2OH an der Reaktion teilnimmt, dessen Konzentration und chemische Beschaffenheit die thermodynamischen und/oder kinetischen Funktionen des katalytischen Systems verändern können^[10]. Trotzdem ergeben derart katalysierte Synthesen in organischen Medien oftmals eine höhere Enantioselektivität als die zugehörigen Hydrolysen in Wasser. Eine Erklärung dieses Befundes wird im folgenden versucht.

Im Anfangsstadium der Reaktion kann die in Schema 3 dargestellte komplizierte Katalyse-Sequenz auf einen minimalen Reaktionsmechanismus reduziert werden, der zwei bindungslösende und zwei bindungsbildende Schritte umfaßt (Schema 4). Hierbei sind k_a , k_b , k_a' und k_b' Netto-Reaktionskonstanten^[55].



Schema 4.

Für die Kinetik sind k_a und k_a' gleichbedeutend mit k_{cat}/K_m für A bzw. B, und k_b und k_b' repräsentieren die Bindungsfähigkeit und die katalytischen Eigenschaften der diastereomeren Acyl-Enzym-Komplexe gegenüber dem achiralen Nucleophil R^2OH . Die Implikation dieser Netto-Reaktions-

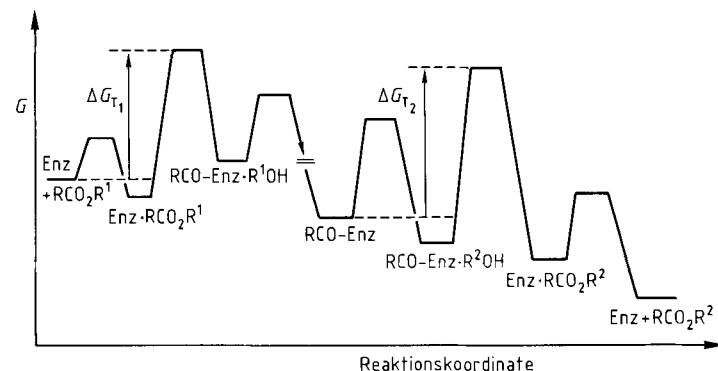


Abb. 2. Darstellung der Reaktionskoordinate zur Verdeutlichung einer Lipase-katalysierten Umesterung.

konstanten kann weiterhin durch Abbildung 2 illustriert werden. Für k_a und k_b gelten Gleichung (4) bzw. (5).

$$k_a = \exp(-\Delta G_{T_1}/RT) \quad (4)$$

$$k_b = \exp(-\Delta G_{T_2}/RT) \quad (5)$$

Sind die Umsetzungsgeschwindigkeiten für das Substrat A und das konkurrierende Substrat B durch v_A und v_B gegeben, so führt die Methode der Netto-Reaktionskonstanten von Cleland^[55] zu den Gleichungen (6) bzw. (7).

$$[\text{Enz}]_0/v_A = 1/k_a[A] + (1/k_b + k_a'[B]/k_a k_b'[A]) \cdot 1/[ROH] \quad (6)$$

$$[\text{Enz}]_0/v_B = 1/k_a'[B] + (1/k_b' + k_A[A]/k_a' k_b[B]) \cdot 1/[ROH] \quad (7)$$

Diese beiden Gleichungen zeigen deutlich, daß die Diskriminierung zwischen zwei miteinander konkurrierenden Substraten durch die gesamte Reaktionssequenz bestimmt ist.

Bei einer Hydrolyse wird die Spezifität wegen der hohen Konzentration des Lösungsmittels Wasser (55.5 M) teilweise verloren gehen. Folglich können in den Gleichungen (6) und (7) die zweiten Glieder, die hauptsächlich die Beiträge der auf den ersten irreversiblen Schritt folgenden Schritte repräsentieren, vernachlässigt werden. Damit folgt

$$[\text{Enz}]_0/v_A = 1/k_a [A] \quad (8)$$

$$[\text{Enz}]_0/v_B = 1/k'_a [B] \quad (9)$$

Vereinigen der Gleichungen (8) und (9) ergibt die bekannte Gleichung (10)^[52]

$$v_A/v_B = (k_a/k'_a) \cdot ([A]/[B]) \quad (10)$$

die ausdrückt, daß die Enantioselektivität bei Hydrolysen ausschließlich aus der Abfolge der katalysierten Umsetzungen bis einschließlich zum ersten irreversiblen Schritt resultiert. Dieser Unterschied erklärt, warum die Enantiomerenreinheit der Produkte in einigen Fällen dadurch gesteigert werden kann, daß man die Hydrolyse in Wasser durch eine biokatalysierte Um- oder Veresterung in organischen Lösungsmitteln ersetzt^[10, 18, 57].

Man sollte jedoch berücksichtigen, daß sich bei Enzym-katalysierten Kondensationsreaktionen allmählich Produkte (R^1OH und RCO_2R^2) anhäufen, die die Katalyse umkehren. Daher spielt die Gleichgewichtskonstante (K) nicht nur eine Schlüsselrolle für die Beschreibung der Enzym-vermittelten Enantioselektivität, sondern auch für die maximal erzielbare chemische Ausbeute [$x = 100/(1 + K)[\%]$]. Um die fortlaufenden Veränderungen im stereochemischen Verhalten von Enzymen verstehen zu können, wird das Reaktionsschema zu den Gleichungen (11) und (12) vereinfacht.



Dabei sind k_1 , k_2 , k_3 und k_4 die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktionen. In einer achiralen Umgebung sollten die Gleichgewichtskonstanten für ein Enantiomerenpaar gleich sein [Gl. (13)].

$$K = k_2/k_1 = k_4/k_3 \quad (13)$$

Dieser Zusammenhang zeigt, daß der bevorzugte Chiralitätsinn der Hin- und Rückreaktion erhalten bleibt, d. h. wenn $k_2 > k_4$, ist auch $k_1 > k_3$.

Unter der Annahme, daß die Konzentration des Acylacceptors im Sättigungsbereich des Enzyms bleibt, wird für reversible, biokatalysierte Systeme zur Berechnung der Enantioselektivität E ein neuer Ausdruck benötigt, der den thermodynamischen Parameter K enthält [Gl. (14)]. Hier ist $E = k_1/k_3$.

$$\frac{\ln [1 - (1 + K)(1 - [A]/[A]_0)]}{\ln [1 - (1 + K)(1 - [B]/[B]_0)]} = E \quad (14)$$

Falls k_2 und $k_4 = 0$, vereinfacht sich Gleichung (14) zu Gleichung (3), die den homokompetitiven Fall beschreibt^[52]. Um die wichtigen Parameter Umsatz (c), Enantiomerenüberschuß des Substrates (ee_s) und Enantiomerenüberschuß des Produktes (ee_p) miteinander in Beziehung zu bringen, kann Gleichung (14) alternativ auch in die Gleichungen (15) und (16) transformiert werden.

$$\frac{\ln [1 - (1 + K)(c + ee_s \{1 - c\})]}{\ln [1 - (1 + K)(c - ee_s \{1 - c\})]} = E \quad (15)$$

$$\frac{\ln [1 - (1 + K)c(1 + ee_p)]}{\ln [1 - (1 + K)c(1 - ee_p)]} = E \quad (16)$$

Diese Gleichungen zeigen, daß die Enantioselektivität Enzym-katalysierter Synthesen von dem komplexen Zusammenhang zwischen kinetischen (E) und thermodynamischen (K) Funktionen abhängt. Der berechnete Verlauf^[10] der Gleichungen (15) und (16) (Abb. 3) verdeutlicht, daß die Höhe der optischen Ausbeuten für beide Substrate in einem inversen Zusammenhang zur Größe von K steht. Darüber

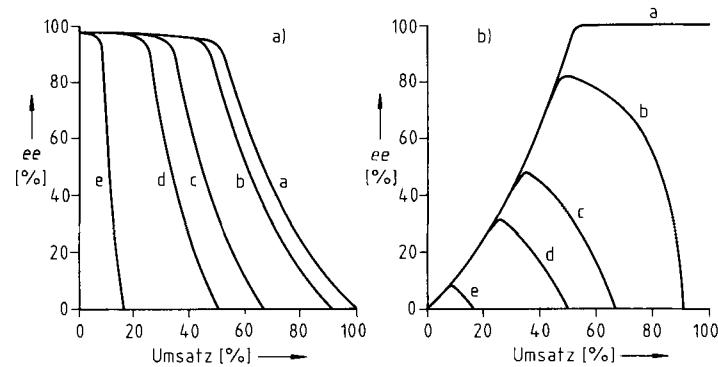
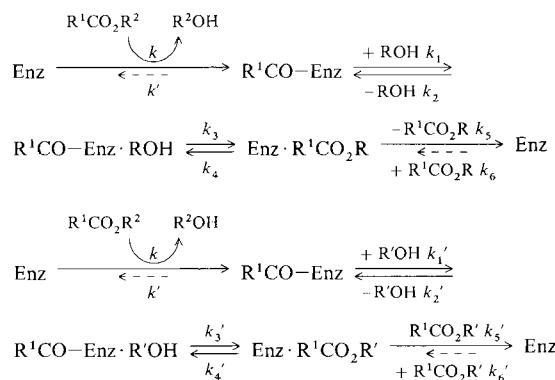


Abb. 3. Nach den Gleichungen (13) und (14) berechnete prozentuale Enantiomerenüberschüsse a) des Produktes und b) des nicht-umgesetzten Substrats als Funktion des prozentualen Umsatzes für $E = 100$ und $K = 0$ (a), 0,1 (b), 0,5 (c), 1,0 (d), 5,0 (e) [10] (wiedergegeben mit Genehmigung aus J. Am. Chem. Soc. 109 (1987) 2812. Copyright 1987 American Chemical Society).

hinaus kann selbst bei einem sehr kleinen Wert für K eine hohe optische Reinheit des zurückbleibenden Substrats ($ee_s \geq 99\%$) auch nicht dadurch erreicht werden, daß der maximale Umsatz erheblich über 50% erhöht wird. Nach Ermittlung der Werte für E und K kann mit diesen graphischen Darstellungen präzise vorhergesagt werden, wann die kinetischen Racematspaltungen abgebrochen werden müssen, um möglichst hohe chemische und optische Ausbeuten zu erhalten.

4.2. Racematspaltung von Alkoholen durch enantioselektive Estersynthese

In Schema 5 sind ROH (A) und R'OH (B) zwei miteinander konkurrierende Enantiomere. Die nucleophilen Gruppen eines jeden Enantiomers können mit dem acylierten Enzym (R^1CO -Enz) unterschiedlich wechselwirken und zu unterschiedlichen Übergangszuständen führen (Abb. 4).



Schema 5.

Die sich daraus ergebende Differenz in den Aktivierungsenergien ($\Delta\Delta G_T$) bestimmt die Enantioselektivität der Biokatalyse. Von den Faktoren, die die stereochemischen Eigenchaften des biokatalysierten Systems beeinflussen, ist die

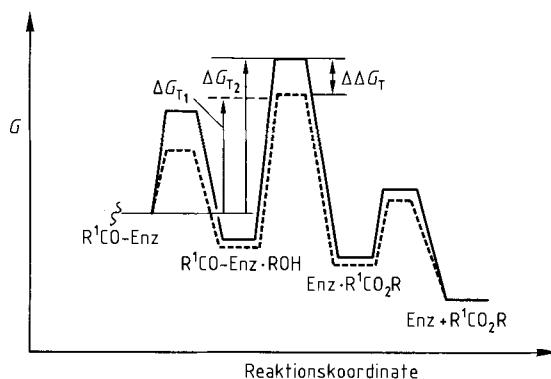
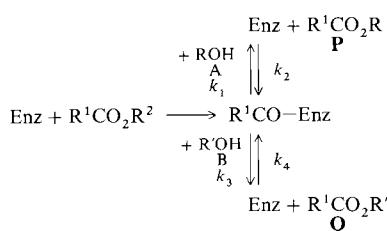


Abb. 4. Darstellung der Reaktionskoordinate zur Verdeutlichung der enzymatischen Racematspaltung eines Alkohols durch enantiospezifische Veresterung. - - -: Enantiomer 1, —: Enantiomer 2.

Art des Acyldonors besonders wichtig. Seine Rolle kann folgendermaßen zusammengefaßt werden: a) Da die kinetische Unterscheidung zwischen zwei Enantiomeren unabhängig vom Transfer der Acylgruppe zum Enzym ist, beeinflußt die Art des Acyldonors – ob Säure oder Ester –, die Diskriminierung und den Wert von E nicht; b) da die Acylgruppe des acylierten Enzyms den Desacylierungsprozess sterisch und/oder stereoelektronisch beeinflußt, kann prinzipiell durch Wahl eines geeigneten Acyldonors eine hoch-enantioselektive Veresterung erreicht werden; c) da die Reaktion reversibel ist, können Konzentration und Art des Acyldonors die Gleichgewichtskonstante verändern und dadurch das stereochemische Verhalten der Biokatalyse beeinflussen.

Um die kinetische Behandlung zu vereinfachen, kann der in Schema 5 skizzierte Mechanismus vereinfacht werden (Schema 6).



Schema 6.

Die Geschwindigkeit des Verbrauchs der Enantiomere A und B kann durch Gleichung (17) und (18) beschrieben werden.

$$v_A = k_1 [A][RCO-Enz] - k_2 [P][Enz] \quad (17)$$

$$v_B = k_3 [B][RCO-Enz] - k_4 [Q][Enz] \quad (18)$$

Diese Gleichungen zeigen, daß die relativen Konzentrationen an acyliertem und freiem Enzym beide Reaktionsgeschwindigkeiten beeinflussen. Im Sättigungsbereich für den Acyldonor bleibt das Verhältnis der Konzentrationen des acylierten und des freien Enzyms konstant. Vereinigung der Gleichungen (17) und (18) und anschließende Integration führten zum gleichen Format wie dem der Gleichungen (15) und (16). Bei niedrigen Konzentrationen an Acyldonor verändern sich die Anteile an acyliertem und an freiem Enzym jedoch mit fortschreitender Reaktion^[56]. Als Resultat wird das stereochemische Verhalten des Systems komplizierter und kann nicht mehr mit den Gleichungen (15) und (16) vorhergesagt werden. In der Praxis wäre es wünschenswert, das gesamte freie Enzym zu acylieren, so daß die Rückreaktion zu vernachlässigen ist.

5. Bemerkungen zu experimentellen Parametern

5.1. Auswahl des organischen Lösungsmittels

Die Art des organischen Lösungsmittels wird von größtem Einfluß auf die Reaktionskinetik und die Stabilität des Biokatalysators sein. Im allgemeinen nimmt die Effizienz der enzymatischen Katalyse mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels ab^[57]. Hydrophile Lösungsmittel können Enzyme dadurch denaturieren, daß sie in den hydrophoben Kern der Proteine eindringen und dabei die empfindliche funktionale Struktur zerstören^[58], oder dadurch, daß sie das essentielle Wasser vom Enzym ablösen^[59]. Kürzlich wurden einige generelle, empirische Regeln für die Optimierung der

Tabelle 4. log-P-Werte der am häufigsten benutzten Lösungsmittel [a].

Lösungsmittel	log P	Bemerkungen
Dodecan	6.6	Unpolare Lösungsmittel, die sich für Umsetzungen unter Verwendung getrockneter, pulverisierter Enzyme eignen
Octan	4.5	
Heptan	4.0	
Hexan	3.5	
Cyclohexan	3.2	
Toluol	2.5	
Benzol	2.0	
Chloroform	2.0	
Butylacetat	1.7	
Diethylether	0.85	
Butanol	0.80	Schwach bis stark polare Lösungsmittel, die die katalytische Aktivität von Enzymen verringern können; zum Erzielen optimaler Aktivität ist eine Immobilisierung der Enzyme ratsam
Pyridin	0.71	
Ethylacetat	0.68	
Tetrahydrofuran	0.49	
Aceton	-0.23	
Ethanol	-0.24	
Acetonitril	-0.33	
Methanol	-0.76	
Dimethylformamid	-1.0	
Dioxan	-1.1	
Dimethylsulfoxid	-1.3	

[a] In [61] sind sämtliche log-P-Werte für Lösungsmittel aufgeführt. P ist der Verteilungskoeffizient im zweiphasigen Octanol-Wasser-Standardsystem.

biokatalysierenden Aktivität in organischen Lösungsmitteln formuliert. Als quantitatives Maß für die Lösungsmittelpolarität wurde der Parameter $P^{[60]}$, der Verteilungskoeffizient des Lösungsmittels zwischen Octanol und Wasser, eingeführt^[61, 62] (Tabelle 4). Im allgemeinen ist die katalytische Aktivität in polaren Lösungsmitteln mit $\log P < 2$ gering, in Lösungsmitteln mit $\log P$ zwischen 2 und 4 mäßig und in unpolaren Lösungsmitteln mit $\log P > 4$ hoch. Durch Immobilisieren der Enzyme an hydrophilen Trägern kann ihre Instabilität in polaren Lösungsmitteln jedoch partiell überwunden werden^[61]. Die technischen Aspekte bei der Auswahl der Medien für solche biokatalytisch aktiven Systeme sind in einem detaillierten Bericht^[61] zusammengestellt.

Weiterhin muß die Löslichkeit von Substrat und Produkt in den Medien berücksichtigt werden^[63]. Enzyme sind Katalysatoren und beschleunigen als solche nur die Einstellung des chemischen Gleichgewichts. Daher können die physikalischen Eigenschaften der unpolaren Umgebung die Lage des Gleichgewichts und damit die chemische Ausbeute der Reaktion bestimmen. Wegen der einzigartigen Eigenschaft der Lipasen, an Grenzflächen katalytisch aktiv zu sein, wird man deshalb ein Lösungsmittelsystem wählen, in dem das Substrat Micellen oder Emulsionen bilden kann, das Produkt jedoch völlig gelöst ist. In der Regel werden unpolare Lösungsmittel wie Hexan, Isooctan, Toluol und Cyclohexan für Lipase-vermittelte Reaktionen eingesetzt. Auch Halogenkohlenwasserstoffe^[64] wie Trichlortrifluorethan sowie *tert*-Butyl- und Diisopropylether^[65] werden erfolgreich angewendet. Sind die Substrate jedoch stark hydrophil, so eignen sich in Gegenwart immobilisierter Enzyme oder auf Kosten der Enzymstabilität polare Lösungsmittel wie DMF, Pyridin oder Butanol^[61].

5.2. Wassergehalt organischer Medien

Veresterungen und Umesterungen können entweder in einphasigen, nahezu wasserfreien organischen Medien (Wassergehalt < 1 %) oder in wäßrig-organischen zweiphasigen Systemen ausgeführt werden. Im letzteren Fall befindet sich das Enzym in der wäßrigen Phase und ist von der organischen Phase umgeben. Da Enzyme in hydrophoben, organischen Lösungsmitteln unlöslich sind, bilden sie Emulsionen. Deshalb muß das Reaktionsgemisch geschüttelt oder gerührt werden, oder das Enzym setzt sich ab. Obgleich aus den veröffentlichten experimentellen Vorschriften nicht klar ersichtlich ist, wieviel Wasser dem organischen Lösungsmittel zugesetzt werden muß, herrscht jedoch Einigkeit darüber, daß eine Mindestmenge an Wasser absolut notwendig ist, damit das Enzym als Katalysator wirken kann^[66]. Dies beruht darauf, daß Wasser an vielen Arten nicht-kovalenter, bindender Wechselwirkungen beteiligt ist, die die katalytisch aktiven Konformationen von Enzymen aufrechterhalten. Bei einigen Umesterungsreaktionen sättigt man das nicht-mischbare organische Lösungsmittel mit Wasser, denn die Reaktionsgeschwindigkeit scheint hier mit zunehmendem Wassergehalt anzusteigen^[23]. Für Lactonisierungen (intramolekulare Umesterungen) werden dagegen wasserfreie organische Medien (keine Zugabe von Wasser) bevorzugt^[25]. In diesem Fall ist die Reaktionsgeschwindigkeit relativ gering, und man arbeitet bei höheren Temperaturen (z. B. 65 °C).

5.3. Auswahl der Acyldonoren und Acylacceptoren

Auch die Substrate müssen sorgfältig ausgewählt werden; so könnte man z. B. entweder chirale, racemische Carbonsäuren oder die entsprechenden chiralen, racemischen Ester verwenden. Mechanistisch gesehen reagieren diese beiden Typen von Substraten in allen Schritten bis einschließlich zur Bildung des Acyl-Enzym-Intermediates über unterschiedliche Übergangszustände (Schema 3). Trotz einer scheinbaren Ähnlichkeit können die *E*- und die *K*-Werte für Veresterung und Umesterung folglich unterschiedlich sein. Auch die physikalische Beschaffenheit des Substrats hat einen ausgeprägten Einfluß auf die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion. So ist beispielsweise ein im organischen Medium völlig gelöster Ester wegen der fehlenden Lipid-Wasser-Grenzfläche der enzymatischen Lipolyse weniger zugänglich. Eine Carbonsäure bildet dagegen Micellen oder Emulsionen, die schnell von der Lipase angegriffen werden. Ist die Säure jedoch im organischen Medium unlöslich, wird die Reaktionsgeschwindigkeit wegen des schleppenden Angriffs des Enzyms auf ein festes Substrat deutlich herabgesetzt. Die Trennung des sauren Substrats vom Produkt ist aber oft viel leichter als bei Verwendung eines Esters.

Um eine hoch-enantioselektive Veresterung zu erreichen, muß die Rückreaktion unbedingt minimiert werden. Der durch das Gleichgewicht auferlegte thermodynamische Zwang kann durch mehrere Strategien umgangen werden. Dazu gehören: a) die Verwendung von Enolestern^[19] ($R^1OH =$ Aldehyd oder Keton) oder Anhydriden^[18] als Acyldonoren, so daß keine Alkohol- oder Wassermoleküle entstehen, b) die Verwendung eines geeigneten Acylacceptors ($R^2OH =$ sekundärer Alkohol), um die Rückreaktion zu verhindern^[10], c) die Entfernung von R^1OH , um die Lage des Gleichgewichts zu verschieben (z. B. kann man Molekulsieb zugeben, um bei Veresterungen entstehendes Wasser zu entfernen), und d) die Zugabe des Acylacceptors in großem Überschuß zum Medium, um die relative Konzentration des konkurrierenden Nucleophils R^1OH zu verringern^[10] (Schema 3).

5.4. Bestimmung der *E*- und *K*-Werte

Die Enantioselektivität biokatalysierter Reaktionen wird normalerweise durch den *E*-Wert ausgedrückt^[52], eine biochemische Konstante, die unabhängig von Substratkonzentration und Umsatz ist. Unter der Voraussetzung, daß die Reaktionen irreversibel sind (in Gegenwart sättigender Mengen des achiralen Acyldonors und des achiralen Acylacceptors), befolgen Lipase-katalysierte Veresterungen oder Umesterungen im zweiphasig wäßrig-organischen oder im wasserfreien organischen Medium die konventionelle Gleichung für den homokompetitiven Fall. Im Anfangsstadium sammelt sich nur wenig Produkt an; normalerweise wird die Reversibilität der Reaktion erst bei Umsätzen um 40 % oder größer (Abb. 3) zum Problem. Folglich kann man bei niedrigen Umsätzen durch Bestimmung des Enantiomerenüberschusses des Substrats (ee_s) und des Produktes (ee_p) den Gesamtumsatz (c) nach Gleichung (19) berechnen.

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad (19)$$

Der *E*-Wert läßt sich dann leicht nach Gleichung (20) oder (21) ermitteln^[52].

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - ee_S)]}{\ln[(1 - c)(1 + ee_S)]} \quad (20)$$

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + ee_P)]}{\ln[1 - c(1 - ee_P)]} \quad (21)$$

Darüber hinaus kann durch Einfügen der bei Umsätzen von mehr als 40 % bestimmten Werte für *E*, *c*, *ee_S* und *ee_P* in die Gleichungen (15) und (16) auch der Wert für *K* erhalten werden.

Daß es notwendig ist, die Daten für biokatalysierte Racematspaltungen in organischen Medien quantitativ auszuwerten, wird am besten durch die Analyse einiger veröffentlichter Resultate illustriert (Tabellen 5 und 6). Bei der Lipasekatalysierten enantioselektiven Veresterung von (\pm)-2-

Bromhexansäure **1a** und (\pm)-2-(*p*-Chlorphenoxy)propionsäure **1b**^[7] wurde 1-Butanol als Acylacceptor benutzt. Es ist bemerkenswert, daß die Reaktionen, obwohl sie in Hexan mit nur sehr wenig zugesetztem Wasser (0.1 %) durchgeführt wurden, deutlich reversibel sind. Mit den Gleichungen (20) und (21) ließen sich die *E*-Werte aus den Daten in Tabelle 5 berechnen. Bei **1a** nahm *E* von 300 (30 % Umsatz) auf 3 (67 % Umsatz) und bei **1b** von 17 (45 % Umsatz) auf 4 (65 % Umsatz) ab. Bei einer irreversiblen Reaktion sollte *E* konstant bleiben. Ein ähnlicher Befund ergab sich bei der enantioselektiven Veresterung von (\pm)-Menthol **2** mit Dodecansäure als Acyldonor^[6]. Wieder nahm *E* von 92 (45 % Umsatz) auf 17 (57 % Umsatz) ab. Demnach sind die Reaktionen also reversibel, und es sollten anstelle der Gleichungen (20) und (21) die Gleichungen (15) und (16) zur Berechnung von *E* benutzt werden, da diese den Beitrag der Gleichgewichtskonstante *K* berücksichtigen.

5.5. Bestimmung der kinetischen Parameter *V_{max}* und *K_m*

In vielen Fällen können Informationen über Änderungen der kinetischen Parameter *K_m* (Michaelis-Konstante) und *V_{max}* bei Einführung eines Substituenten in ein Substratmolekül wichtig sein. Wie bereits in Abschnitt 2 erwähnt, finden Lipase-katalysierte Reaktionen an der Grenzfläche zwischen Öl und Wasser oder zwischen Micellen und Wasser statt^[33]. Da die Lipase reversibel an die Grenzfläche adsorbiert wird, kann der experimentell bestimmte „scheinbare *K_m*-Wert“ die Dissoziationskonstante des an der Grenzfläche adsorbierten Enzym-Substrat-Komplexes, die hier als *K_m** bezeichnet wird, repräsentieren. Auch der Wert für *V_{max}*, der in Gegenwart von das Enzym sättigenden Mengen an Lipid-Substrat gemessen wird, ist nur eine scheinbare Größe, und zwar das Produkt aus dem wirklichen Wert für *V_{max}* und dem Faktor *Su/(K_m* + Su)*. Dieser Faktor gibt dabei den Anteil der Enzymmoleküle in der Enz^{*}Su-Form an.

Um das Grenzflächenproblem zu überwinden, wählten Hirohara et al.^[67] experimentelle Bedingungen, unter denen alle Enzymmoleküle an der Phasengrenze adsorbiert sind; dazu wurde die Grenzfläche durch heftiges Rühren (1000 U/min) vergrößert und dann die Substratkonzentration gesteigert. Die Autoren nahmen an, daß unter diesen Bedingungen die Konzentration des Enzyms an der Grenzfläche durch die Konzentration in der Lösung gegeben ist. Lineweaver-Burk-Auftragungen, in denen die Substratkonzentration in mol L⁻¹ anstatt in m² L⁻¹ ausgedrückt wurde, ergaben Geraden, aus denen *K_m* und *V_{max}* berechnet werden konnten. In jedem Fall ist die akkurate Bestimmung von *K_m* und *V_{max}* unter nicht-kompetitiven Bedingungen ein schwieriges Problem. Dies gilt besonders für den *K_m*-Wert des langsamer reagierenden Enantiomers.

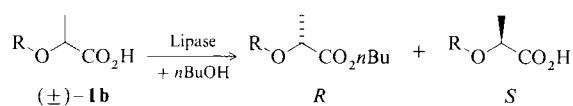
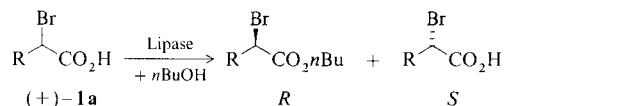
Theoretisch können die kinetischen Parameter *K_m* und *V_{max}* für beide Enantiomere A und B auch direkt mit den Gleichungen (22) und (23) aus Daten von Messungen unter Konkurrenzbedingungen berechnet werden^[68].

$$t(V_{\max}/K_m)_A + ([A] - [A]_0)[1/(K_m)_A] + ([A]^{1/E} - [A]_0^{1/E}) \cdot x \cdot E \quad (22)$$

$$\frac{1}{[1/(K_m)_B]} = \ln[A]_0/[A]$$

$$t(V_{\max}/K_m)_B + ([B] - [B]_0)[1/(K_m)_B] + ([B]^E - [B]_0^E)(y/E) \cdot \frac{1}{[1/(K_m)_A]} = \ln[B]_0/[B] \quad (23)$$

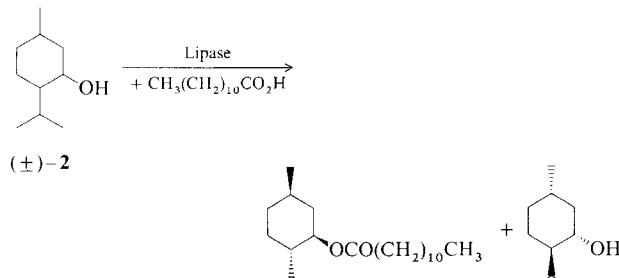
Tabelle 5. Reversible enantioselektive Veresterung der chiralen, racemischen Carbonsäuren **1** in Gegenwart von *C.-cylindracea*-Lipase mit 1-Butanol als Acylacceptor in Hexan (mit 0.1 % H₂O) [7]. *ee* = Enantiomerenüberschuß, *E* = Enantioselektivität.



Substrat	t [h]	Umsatz [%]	ee [%] Produkt (R-Ester)	ee [%] Substrat (S-Säure)	E [a]
(±)-1a	n-C ₄ H ₉	19	30	99	—
		48	67	—	62
(±)-1b	p-ClC ₆ H ₄	40	45	79	—
		168	65	—	65

[a] Mit Gleichung (20) und (21) berechnet.

Tabelle 6. Reversible, enantioselektive Veresterung des chiralen, racemischen Alkohols **2** in Gegenwart von *C.-cylindracea*-Lipase mit Dodecansäure als Acyldonor in Hexan oder Heptan [6] [a].



T [°C]	t [h]	Umsatz [%]	ee [%] Produkt (Ester)	ee [%] Substrat (Alkohol)	E
45	8	45	95	—	92
40	88	57	69	88	17

[a] Ob in Hexan oder Heptan gearbeitet wurde, geht aus der Originalveröffentlichung [6] nicht hervor.

Hier bezeichnen $[A]_0$ und $[B]_0$ die Anfangskonzentrationen, E die Enantioselektivität, $x = ([B]_0/[A]_0)^{1/E}$, $y = ([A]_0/[B]_0^E)$, t ist die Zeit und $(K_m)_A$, $(K_m)_B$, $(V_{max})_A$ und $(V_{max})_B$ sind die Michaelis-Konstanten bzw. die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten für A und B. Durch Einfügen des Wertes für E und von mindestens drei Sätzen experimenteller Daten $[(t_1, [A]_1), (t_2, [A]_2), (t_3, [A]_3)]$ und $[(t_1, [B]_1), (t_2, [B]_2), (t_3, [B]_3)]$ in die Gleichungen (22) und (23) können die Werte für V_{max}/K_m , K_m und V_{max} für jedes Enantiomer A und B leicht berechnet werden.

6. Asymmetrische Katalyse in organischen Lösungsmitteln

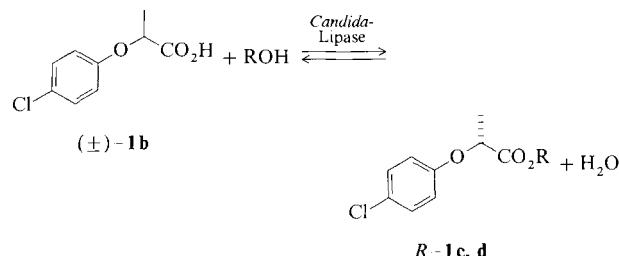
Da Lipase-katalysierte Reaktionen meist als Hydrolysen in Wasser ausgeführt werden^[69], überrascht es nicht allzu sehr, daß bislang nur relativ wenige Beispiele für enantioselektive und enantiotop-differenzierende Veresterungen in nicht-wässrigen Medien veröffentlicht wurden. Nichtsdestoweniger sollten die in den Tabellen 7–11 aufgeführten Daten dem Chemiker einen Einblick in die Brauchbarkeit dieser unkonventionellen Methodik geben. Obwohl die Gleichungen (15) und (16) für die Berechnung der E -Werte herangezogen werden sollten, wurden die Gleichgewichtskonstanten für diese Systeme leider nicht bestimmt. Daher wurden die in den Tabellen 7, 9 und 11 angegebenen E -Werte mit den Gleichungen (20) und (21) berechnet. Es handelt sich also um scheinbare, minimale Werte und nicht um die wirklichen E -Werte.

6.1. Optisch aktive Carbonsäuren und Ester

Die meisten der biokatalysierten kinetischen Racematspaltungen chiraler, racemischer Carbonsäuren wurden in der hydrolytischen Richtung in Wasser durchgeführt^[69], weil die Geschwindigkeit der Hydrolyse in Wasser im allgemeinen größer ist als die der entsprechenden Veresterung in organischen Medien. Ist die Hydrolysegeschwindigkeit in Wasser dagegen bereits niedrig, so muß man annehmen, daß eine entsprechende Veresterung in organischen Medien in den meisten Fällen noch langsamer verläuft.

Die katalytische Aktivität von Enzymen wird sowohl durch elektronische als auch durch sterische Effekte stark beeinflußt. So werden z. B. Carbonsäuren, die einen Elektronen-abgebenden oder sterisch anspruchsvollen Substituenten (z. B. Isopropyl oder größer) benachbart zur Carboxygruppe enthalten, von Lipasen nur langsam oder gar nicht angegriffen, wobei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes ist. In diesen Fällen kann eine Umesterung die Katalysegeschwindigkeit erhöhen. Die chirale, racemische Carbonsäure wird zunächst nicht-enzymatisch zu einem aktivierten Ester (z. B. Chlorehylester) umgesetzt, der sich dann durch den Biokatalysator besser nucleophil angreifen läßt. *Klibanov et al.*^[71] konnten bei Verwendung der Lipase aus *Candida cylindracea* mit Substraten wie **1a** und **1b**, die eine elektronegative Gruppe benachbart zur Carboxyfunktion enthalten, gute katalytische Aktivitäten und Enantioselektivitäten beobachten (vgl. Tabelle 5). Mit Substraten ohne elektronegativen Substituenten wurde hingegen nur eine geringe Aktivität festgestellt.

Tabelle 7. Vergleich zwischen Lipase-katalysierter enantioselektiver Veresterung der Säure (\pm)-**1b** im organischen Lösungsmittel und enantioselektiver Hydrolyse in Wasser. Bedingungen: $t = 27$ h (**1c**) und 100 h (**1d**), $T = 25^\circ\text{C}$, Solvens Isooctan.

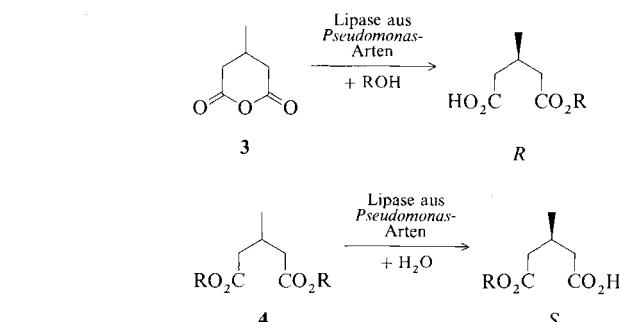


R - **1c, d**

Synthese		R	Stereochem. Präferenz	ee_s [%]	ee_p [%]	Umsatz [%]	E [a]
1c	<i>n</i> Bu			12	81	13	10
1d	Cyclohexyl			25	97	20	84
Hydrolyse		R	Stereochem. Präferenz	ee_s [%]	ee_p [%]	Umsatz [%]	E [a]
1c	<i>n</i> Bu			24	20	55	2
1d	Cyclohexyl			94	73	56	22

[a] Mit Gleichung (20) und (21) berechnet.

Tabelle 8. Vergleich zwischen Lipase-katalysierter enantiotop-differenzierender Acylierung unter Verwendung des Anhydrids **3** im organischen Lösungsmittel und Desacylierung des Esters **4** in Wasser. Bedingungen: $t = 6$ h, $T = 25^\circ\text{C}$, Solvens Diisopropylether [18a].



Acylierung			Desacylierung			
R	Stereochem. Präferenz	ee [%]	Umsatz [%]	Stereochem. Präferenz	ee [%]	Umsatz [%]
CH ₃	pro-R	87	92	pro-R	74	50
<i>n</i> Bu	pro-R	91	74	—	—	—

In Tabelle 7 wird die Enantioselektivität entsprechender Veresterungen mit Hydrolysen von 2-(*p*-Chlorphenoxy)propionaten verglichen. In beiden Versuchsreihen ist die beobachtete Enantioselektivität (E -Wert) für die Veresterung in organischen Lösungsmitteln vier- bis fünfmal höher als die für die zugehörige Hydrolyse in Wasser. Ähnlich zeigen die Angaben in Tabelle 8, daß der Enantiomerenüberschuß (ee_p) des Produktes, hier (*S*)-3-Methylglutarsäuremonomethyl-ester, bei der enzymatischen Acylierung im organischen Lösungsmittel^[18a] höher ist als bei der enzymatischen Hydrolyse des Diesters in Wasser.

Über den Einfluß des Acylacceptors auf die Enantioselektivität kann bis heute keine zuverlässige Aussage gemacht werden. Man könnte zwar mutmaßen, daß sich die Enantioselektivität vielleicht durch Verwendung eines chiralen Alko-

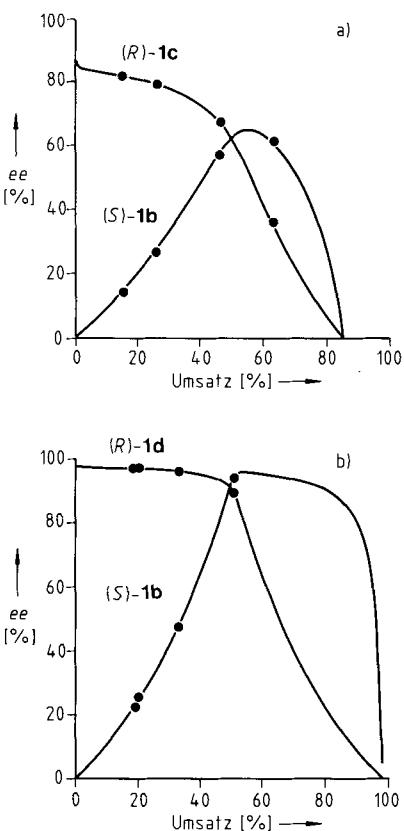
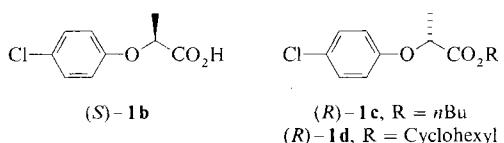


Abb. 5. Durch *Candida*-Lipase katalysierte, enantiospezifische Synthese der 2-(*p*-Chlorphenoxy)propionsäureester **1c** und **1d** aus der Säure (\pm)-**1b** in Isooctan[10]. + = Experimentelle Werte. Die Kurven, die den Zusammenhang zwischen Enantiomerenüberschüß und Umsatz wiedergeben, wurden anhand der Gleichungen (15) und (16) unter Verwendung der scheinbaren Konstanten E und K berechnet. a) Bildung des Butylesters **1c**, $E = 12$, $K = 0.15$; b) Bildung des Cyclohexylesters **1d**, $E = 84$, $K = 0.02$ (wiedergegeben mit Genehmigung aus *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 2812. Copyright 1987 American Chemical Society).



hols verbessern ließe, doch wird für achirale Alkohole in vielen Fällen ein höherer Wert als für chirale Alkohol beobachtet^[77]. Die passende Kombination racemischer Carbonsäuren mit racemischen Alkoholen in einer doppelten kinetischen Racematspaltung ist jedoch eine interessante Aufgabe, die eine systematische Erforschung verdient.

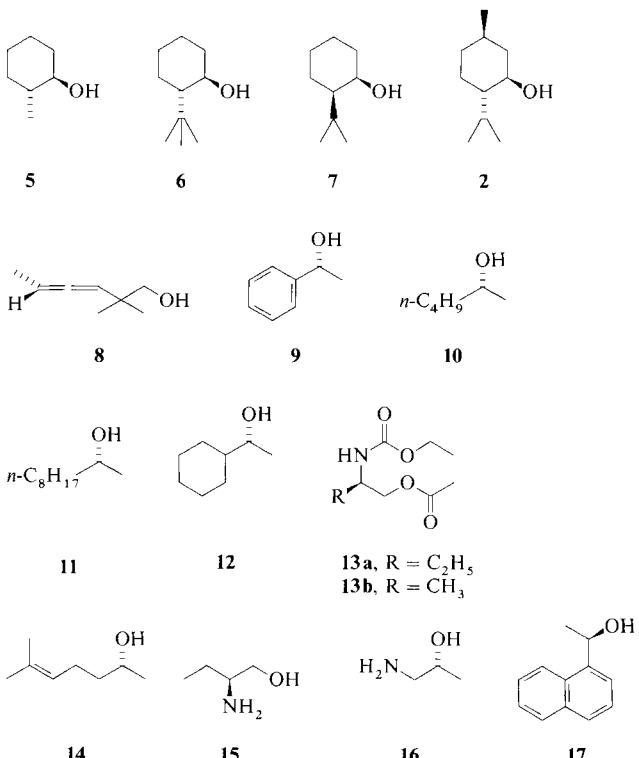
In Abbildung 5a ist am Beispiel der Lipase-vermittelten enantioselektiven Bildung von 2-(*p*-Chlorphenoxy)propionsäureestern **1c**, **d**^[10] illustriert, daß sich die Art der katalysierten Reaktion bei zunehmender Hydrolyse umkehren kann. In Gegenwart eines Überschusses an 1-Butanol als Acylacceptor greift die *Candida*-Lipase bevorzugt das (*R*)-Enantiomer an. Der E -Wert dieses Systems war nur mäßig ($E = 12$), und K wurde zu 0.15 bestimmt. Wie in Abbildung 5a gezeigt, ist ein solches reversibles System dadurch charakterisiert, daß die optische Reinheit (ee_s) des nicht-umgesetzten Substrates abnimmt, wenn der Umsatz über 50 % gesteigert wird. Dies steht in deutlichem Widerspruch zum irreversiblen Fall, bei dem ee_s zunimmt, wenn der Umsatz erhöht wird (Abb. 5b). Hier ist die Verwendung von Cyclohexanol als Acylacceptor vorteilhaft, denn Ester sekundärer Alkohole sind resistenter gegenüber enzymatischer Hydroly-

se als Ester primärer Alkohole. Der K -Wert für dieses System ist auf 0.02 reduziert, und die Kurve für das verbleibende Substrat deckt sich besser mit der für den irreversiblen Fall (Abb. 5b).

6.2. Optisch aktive Alkohole

Lipasen katalysieren die asymmetrische Acylierung einer breiten Palette cyclischer und acyclischer Substrate mit mäßiger bis hoher Enantioselektivität (Tabellen 9 und 10); Ausnahmen sind bestimmte, sterisch gehinderte Alkohole.

Tabelle 9. Lipase-katalysierte enantioselektive Acylierung der Alkohole **5** bis **17** sowie **2**.



Substrat [a]	Stereochem. Acyldonor Präferenz	Umsatz [%]	ee _s [%]	ee _p [%]	E [b]	Lit.
<i>Candida-cylindracea</i> -Lipase						
(\pm)- 5	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>	Dodecansäure	44	80	98	> 100
(\pm)- 6	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	Dodecansäure	34	–	≈ 100	> 100
(\pm)- 7	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>	Dodecansäure	30	–	88	23
(\pm)- 2	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>	Dodecansäure	45	–	95	92
(\pm)- 8	<i>R</i>	Dodecansäure	31	32	72	8
(\pm)- 9	<i>R</i>	Dodecansäure	35	50	93	45
<i>Mucor-miehei</i> -Lipase						
(\pm)- 10	<i>R</i>	Octansäure	51	87	83	30
(\pm)- 11	<i>R</i>	Octansäure	49	83	87	38
(\pm)- 12	<i>R</i>	Octansäure	44	67	86	27
(\pm)- 9	<i>R</i>	Octansäure	45	71	87	31
Ungereinigte Lipase aus Schweinepankreas (PPL)						
(\pm)- 13a	<i>R</i>	Ethylacetat	41	65	≥ 95	78
(\pm)- 13b	<i>R</i>	Ethylacetat	51	≥ 95	90	> 100
(\pm)- 14	<i>R</i>	Trichlorethylbutyrat	30	66	88	22
(\pm)- 14	<i>R</i>	Trifluorethyl-dodecanoat	52	> 97	91	> 100
(\pm)- 15	<i>S</i>	Ethylacetat	–	> 95	> 95	> 100
(\pm)- 16	<i>R</i>	Ethylacetat	–	–	> 95	–
(\pm)- 17	<i>R</i>	Trichlorethylbutyrat	49	≈ 93	≈ 100	> 100

[a] Oben abgebildet sind die Enantiomere der Substrate, die bevorzugt umgesetzt werden. [b] Mit Gleichung (20) und (21) berechnet.

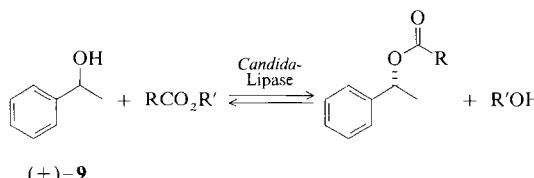
Tabelle 10. Lipase-katalysierte enantiotop-differenzierende Acylierung der Alkohole **18** bis **22**.

	18a, R = CH(CH₃)₂
	18b, R = (CH₂)₂CH=CH₂
	18c, R = C₆H₅
	18d, R = Cyclohexyl
	18e, R = OCH₂C₆H₅
	19
	20
	21
	22a, X = OCH₂CH₃
	22b, X = OCH₂CH₂CH₃
	22c, X = HCl

Substrat	Stereochem. Präferenz	Acyldonor	Umsatz [%]	ee [%]	Lit.
P1-Fraktion der Lipase aus Schweinepankreas					
18a	pro- <i>R</i>	Methylacetat	91	65	[9]
18b	pro- <i>R</i>	Methylacetat	70	90	[9]
18c	pro- <i>R</i>	Methylacetat	98	92	[9]
18d	pro- <i>R</i>	Methylacetat	90	58	[9]
19	pro- <i>R</i>	Methylacetat	-	96	[9]
Lipase aus <i>Pseudomonas</i> -Arten					
18e	pro- <i>S</i>	Isopropenylacetat	53	96	[19]
Ungereinigte Lipase aus Schweinepankreas					
20	pro- <i>S</i>	Methylacetat	-	84	[14]
21	pro- <i>S</i>	Trichlorethylacetat	48	95	[20]
22a	pro- <i>S</i>	Methylacetat	57	26	[14]
22b	pro- <i>S</i>	Methylacetat	74	68	[14]
22c	-	Methylacetat	79	84	[14]

Um eine hoch-enantioselektive Acylierung zu erzielen, sind die Wahl eines geeigneten Biokatalysators und die Opti-

Tabelle 11. Durch die Lipase aus *C. cylindracea* katalysierte, enantioselektive Acylierung von (\pm)-1-Phenylethanol (\pm)-**9**.



(\pm)-9

Acyldonor	t [h]	Umsatz [%]	ee _s [%]	ee _p [%]	E
Buttersäure	66	39	54	84	20
Tributyrlyglycerin	100	10	10	89	19
Octansäure	66	20	24	94	41
Trioctanoylglycerin	100	< 5	-	-	-
Dodecansäure	66	19	22	95	46
Hexadecansäure	66	14	15	95	45
5-Phenylvaleriansäure	100	< 5	-	-	-

[a] Mit Gleichung (20) und (21) berechnet.

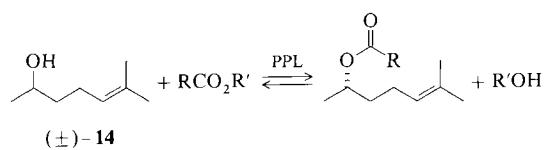
mierung der Reaktionsbedingungen von großer Bedeutung. Der Acyldonor kann einen ausgeprägten Einfluß auf das stereochemische Verhalten des Enzymsystems ausüben. Dies

soll an der enantioselektiven Acylierung von racemischem 1-Phenylethanol (\pm)-**9** mit der Lipase aus *Candida cylindracea*^[70] (Tabelle 11) verdeutlicht werden.

Der physikalische Zustand des Acyldonors – als Ester in Lösung oder als Carbonsäure in micellarer Form –, hatte zwar keinen Einfluß auf die Enantioselektivität, wohl aber auf die Katalysegeschwindigkeit. Beispielsweise war die Reaktionsgeschwindigkeit mit Tributyrlyglycerin als Acyldonor nur ca. ein Fünftel so groß wie mit Buttersäure. Eine Verlängerung der Acylgruppe von C₄ auf C₁₂ bedingte höhere Werte für die Enantioselektivität *E*, während für Acyldonoren mit Kettenlängen von C₁₂ und C₁₆ kein signifikanter Unterschied in der Enantioselektivität festgestellt werden konnte. Ähnliche Beobachtungen wurden für die Racemat-spaltung von (\pm)-2-Octanol durch enantioselektive Acylierung mit der Lipase aus *Mucor miehei* mitgeteilt^[16]. In diesem Fall nahm der *E*-Wert für zunehmende Kettenlängen der Alkansäuren bis zu C₈ auf > 50 zu und fiel oberhalb von C₈ ab, stieg aber für die C₁₆-Säure wieder auf > 50. Bemerkenswerterweise variiert somit die für maximale Enantioselektivität benötigte Kettenlänge des Acyldonors mit dem Enzym und mit dem Substrat.

Weiterhin sollte berücksichtigt werden, daß in ungereinigten Lipase-Präparationen miteinander konkurrierende Enzyme vorhanden sein können. Im allgemeinen werden Lipasen aus mikrobiellen Quellen extrazellulär produziert und sind in ihrer lipolytischen Aktivität nahezu homogen^[33]. Im Gegensatz dazu enthalten ungereinigte Präparationen aus Säugetieren und Pflanzen mehrere störende Enzyme, darunter Proteasen und Esterasen, die die entgegengesetzte Enantioselektivität wie die Lipase oder eine geringere Enantioselektivität aufweisen können. Als Folge werden bei Verwendung dieser ungereinigten Lipasen je nach Art der Enzympräparation oft niedrige optische Ausbeuten oder keine reproduzierbaren Resultate erzielt. Um die optische Ausbeute zu erhöhen, können mehrere Maßnahmen getroffen werden. Dazu gehören a) die Behandlung der rohen Enzympräparation mit chemischen Reagentien^[71] (z. B. Serinprotease-Inhibitoren), die die störenden Enzyme deaktivieren; b) eine physikalische Behandlung der rohen Enzympräparation (z. B. Lyophilisieren, partielle Reinigung der Proteine), um konkurrierende Enzyme selektiv zu inaktivieren oder zu entfernen; c) die Auswahl eines geeigneten Acyldonors, der ein schlechteres Substrat für die störenden Enzyme und/oder ein effizienteres Substrat für das Zielenzym ist.

Diese Strategien zur Verbesserung der optischen Reinheit können an mehreren neueren Beispielen verdeutlicht werden, in denen ungereinigte Lipase aus Schweinepankreas (PPL) verwendet wurde. PPL zeigte bei der Veresterung von (\pm)-Sulcatol (\pm)-**14** eine nur mäßige Enantioselektivität^[13]. Nach Dehydratisieren der kommerziell von Sigma erhältlichen PPL-Präparation im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz stieg der *E*-Wert um den Faktor drei.



Obgleich eine Verlängerung des Acylrestes nur einen geringen Einfluß auf die Spezifität des Enzyms hatte, vervierfachte sich der *E*-Wert bei Verwendung des aktivierten Esters Trifluorethylidodecanoat. Durch Kombinieren von Enzymdehydratisierung und Esterauswahl wurde der *E*-Wert nahezu verzehnfacht.

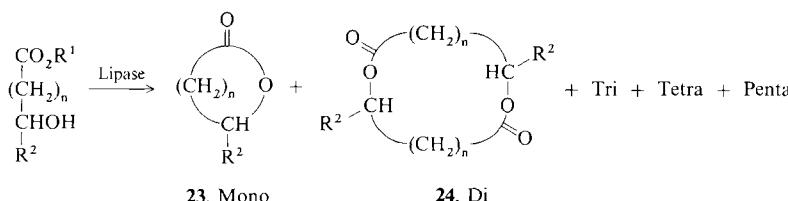
Einige der asymmetrischen Veresterungen in organischen Lösungsmitteln wurden sogar durch die konkurrierenden Enzyme in den ungereinigten Lipase-Präparationen bewirkt. *Ramos Tombo et al.*^[72] konnten kürzlich zeigen, daß eine Esterase-Fraktion aus roher PPL die hoch-enantioselektive Acylierung von 2-substituiertem 1,3-Propandiol katalysiert, während gereinigte PPL nahezu inaktiv ist. Darüber hinaus sind in den ungereinigten PPL-Präparationen mehrere hydrolysierende Enzyme, darunter Cholesterin-Esterase und Chymotrypsin, vorhanden. Zum Beispiel kann die Behauptung^[22], daß rohe Lipase aus Schweinepankreas (PPL) die Bildung von Peptidbindungen katalysiert, durchaus auf eine Kontamination der Präparation mit Chymotrypsin zurückzuführen sein. Eine nur partielle Reinigung von Enzym-Präparationen kann somit zu stärker enantioselektiven Biokatalysatoren führen. Schließlich ist die Existenz der pankreatischen Colipase von Interesse, deren einzige Funktion darin zu bestehen scheint, die durch die Salze von Gallensäuren inhibierte Lipase zu reaktivieren. Es ist jedoch unklar, ob die Colipase V_{max} oder K_m der pankreatischen Lipase verändern kann^[80].

6.3. Makrocyclische Lactone

Lipasen sind auch eingesetzt worden, um makrocyclische Lactone wie **23** durch Lactonisierung von Hydroxsäuren oder deren Estern in organischen Lösungsmitteln im präparativen Maßstab zu synthetisieren^[23, 24].

Neueste Studien^[73] zeigen jedoch, daß die Palette der erhaltenen Produkte mit der Länge der Hydroxsäure und mit der Lipase variiert und daß sie bedeutend reichhaltiger ist als früher angegeben^[23, 24]. Zum Beispiel wurde bei der Behandlung von 10-Hydroxydecansäure mit verschiedenen Lipasen in wasserfreiem Isooctan kein Decanolid gefunden. Statt dessen entstanden komplizierte Gemische aus Di-, Tri-, Tetra- und Pentalactonen, deren Zusammensetzung von der verwendeten Lipase abhing. Eine ähnliche Produktpalette wurde mit Methyl-10-hydroxydecanoat als Substrat erhalten. Bei Behandlung von 16-Hydroxyhexadecansäure mit Lipasen war jedoch Hexadecanolid das Hauptprodukt. Eine Ausnahme bildete die Lipase aus *Mucor miehei*, die bevorzugt Hexadecandiolid bildete. Chirale (ω -1)-Hydroxsäuren (C_8 und C_{13}) wurden von den Lipasen ebenfalls lactonisiert und ergaben Gemische aus hauptsächlich Di- und Trilactonen; Monolactone wurden nicht gefunden (Tabelle 12). Die Enantioselektivität der intramolekularen Veresterung wurde an einer Reihe von diastereomeren, acyclischen Dimeren untersucht, die aus (*R*)- und (*S*)-7-Hydroxyoctansäure hergestellt worden waren^[74]. Die relative Geschwindigkeit der

Tabelle 12. Lipase-katalysierte Lactonisierung von ω -Hydroxycarbonsäuren und deren Estern.

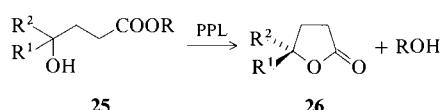


R ¹	R ²	n	Herkunft der Lipase	Bedin-gungen [a]	Ausbeute [%] [b]						
					23 Mono	24 Di	Tri	Tetra	Penta		
H	H	8	<i>Pseudomonas</i> -Arten AK	A	0	53	16	4	*		
			<i>Pseudomonas</i> -Arten K-10	A	0	33	14	15	7		
			Schweinepankreas	A	0	57	20	6	2		
			<i>Candida cylindracea</i>	B	0	2	24	13	*		
			<i>Mucor miehei</i>	B	0	2	22	18	*		
H	H	4	<i>Pseudomonas</i> -Arten AK	A	66	26	*	*	*		
			<i>Pseudomonas</i> -Arten K-10	A	62	30	*	*	*		
			Schweinepankreas	A	46	21	12				
			<i>Candida cylindracea</i>	A	19	15	9				
			<i>Mucor miehei</i>	A	3	43	15				
CH ₃	H	8	Schweinepankreas	A	0	55	24	9	4		
			<i>Candida cylindracea</i>	B	0	0	27	13	6		
			<i>Mucor miehei</i>	A	0	15	46	20	15		
CH ₃	H	14	Schweinepankreas	A	54	5	6	*			
			<i>Candida cylindracea</i>	B	0	24	19	*			
			<i>Mucor miehei</i>	A	0	26	15	*			
R ¹	R ²	n	Herkunft der Lipase	Bedin-gungen [a]	Ausbeute [%] [b]						
					23, Mono	24, Di	R,S	S,S + R,R	Tri-1	Tri-2	Tetra
H	CH ₃	5	<i>Pseudomonas</i> -Arten AK	C	0	5	12	4	3	2	
	CH ₃	10	<i>Pseudomonas</i> -Arten AK	D	0	13	30	11	9	*	
			<i>Pseudomonas</i> -Arten K-10	D	0	4	20	17	20	*	
			<i>Candida cylindracea</i>	A	0	7	21	13	12	*	

[a] Reaktionsbedingungen: A 65 °C, 48 h; B 65 °C, 96 h; C 25 °C, 144 h; D 50 °C, 96 h. [b] Ein Sternchen bedeutet Spur (detektiert im Dünnschichtchromatogramm).

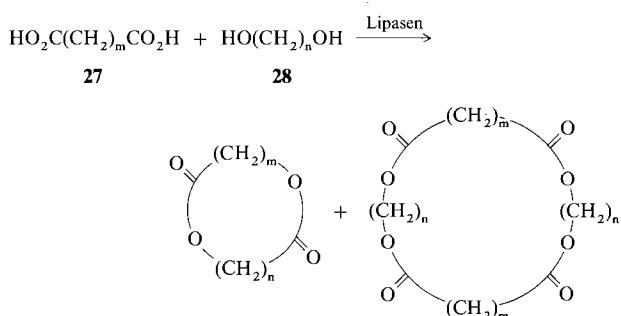
Diolid-Synthese nimmt dabei in der Reihenfolge $RR > RS > SS$ ab; das (*S,R*)-Diastereomer cyclisiert nicht. Diese Resultate deuten darauf hin, daß die räumliche Anordnung der Hydroxygruppe an beiden chiralen Zentren die Lactonisierungsreaktion zu beeinflussen scheint^[73].

Die Lipase aus Schweinepankreas (PPL) katalysiert in wasserfreien organischen Medien wie Ether die nahezu quantitative Lactonisierung einiger γ -Hydroxycarbonsäureester **25**^[75]. Dieses hoch-enantioselektive Verfahren wurde für die Synthese von (*S*)-(–)- γ -Methylbutyrolacton **26**, $R^1 = CH_3$, $R^2 = H$ ($E > 100$), (*R*)-(+)- γ -Methylbutyrolacton **26**, $R^1 = H$, $R^2 = CH_3$, und optisch aktivem γ -Phenylbutyrolacton eingesetzt (ob die (*R*)- oder die (*S*)-Form vorliegt, wurde nicht geprüft).



α -Substituierte γ -Hydroxyester sind allerdings sehr schlechte Substrate für das Enzym. Die Anfangsgeschwindigkeit der Lactonisierung von α -Brom- γ -hydroxybutyrat und von α -Methyl- γ -hydroxybutyrat war jeweils 200- bzw. 50mal geringer als die von γ -Hydroxybutyrat. Interessanterweise verlief die PPL-katalysierte Hydrolyse von racemischen Lactonen mit C_y, C_d oder C_e als stereogenem Zentrum in Wasser nur mit mäßiger Enantioselektivität^[76]; die *E*-Werte lagen zwischen 3 und 20.

Lipasen katalysieren ebenfalls die Bildung makrocyclischer Lactone durch Kondensation von Dicarbonsäuren mit Diolen in wasserfreien organischen Lösungsmitteln wie Isooctan^[25]. Die Hauptprodukte dieser Reaktion waren Mono- und Dilactone, die in einigen Systemen von linearen oligomeren Estern und geringen Anteilen an Trilactonen begleitet waren. Die Ausbeute an Lactonen variierte nicht nur mit den Substraten, sondern auch mit den Reaktionsbedingungen. Die optimale Temperatur für die Lactonisierung lag zwischen 55 und 75 °C; bei niedrigeren Temperaturen (≤ 45 °C) waren oligomere Ester die Hauptprodukte. Die Lipasen akzeptierten acyclische Dicarbonsäuren **27**, $m = 2 - 12$, und Diole **28**, $n = 5 - 16$; die optimale Ausbeute an Lactonen wurde bei Ringgrößen von 24 bis 28 erreicht.



Cyclische und acyclische Dicarbonsäuren und Diole, die Heteroatome enthalten^[77], waren ebenfalls Substrate für die Lipasen. Die Enantioselektivität dieser einzigartigen biokatalysierten Reaktion wurde jedoch noch nicht systematisch studiert.

7. Schlußbemerkung

Die enantioselektive Biokatalyse in organischen Medien präsentiert sich als ein sich rasch entwickelndes Forschungsgebiet, das jedoch noch in den Kinderschuhen steckt, da wir immer noch viel über Enzym- und Proteinkonformationen in Wasser und in organischen Medien lernen müssen. Schon heute wird aber die Nützlichkeit dieser „nicht-wäßrigen“ Methodik durch mehrere Veröffentlichungen über erfolgreiche Versuche deutlich belegt. Bislang sind nur die enantioselektiven Eigenschaften Lipase-katalysierter Veresterungen und Umesterungen in großem Maße genutzt worden. Bei günstiger Wahl entsprechender Biokatalysatoren, Donoren und Acceptor können die biokatalysierten Reaktionen in geeigneten organischen Lösungsmitteln oft mit höherer Enantioselektivität als die zugehörigen Hydrolysen in Wasser verlaufen. Damit ergibt sich für den präparativ arbeitenden Chemiker ein weiterer Weg zur Herstellung optisch aktiver Verbindungen.

Es ist von großer Bedeutung, die möglicherweise breite Palette an Enzymen auszuleuchten, die für biokatalysierte Racematspaltungen verwendet werden könnten. Dieses Arbeitsgebiet befindet sich mitten in einer interessanten und vielversprechenden Entwicklungsphase. Wir hoffen, daß dieser Beitrag das Interesse wecken und eine größere Aktivität auf diesem relativ neuen Gebiet stimulieren wird.

C.S.C. dankt dem Petroleum Research Fund der American Chemical Society für finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 8. November 1988,
ergänzte Fassung am 23. Januar 1989
Übersetzt von Dr. Herbert Waldmann, Mainz [A 721]

- [1] A. A. Klyosov, N. Van Viet, I. V. Berezin, *Eur. J. Biochem.* **59** (1975) 3.
- [2] A. R. Macrae, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **60** (1983) 291.
- [3] B. Cambou, K. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **106** (1984) 2687.
- [4] B. Cambou, K. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **26** (1984) 1449.
- [5] S. Koshiro, K. Sonomoto, A. Tanaka, S. Fukui, *J. Biotechnol.* **2** (1985) 47.
- [6] G. Langrand, M. Secci, G. Buono, J. Baratti, C. Triantaphylides, *Tetrahedron Lett.* **26** (1985) 1857.
- [7] G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **107** (1985) 7072.
- [8] G. Langrand, J. Baratti, G. Buono, C. Triantaphylides, *Tetrahedron Lett.* **27** (1986) 29.
- [9] G. M. Ramos Tombo, H.-P. Schaer, X. Fernandez I Busquets, O. Ghisalba, *Tetrahedron Lett.* **27** (1986) 5707.
- [10] C.-S. Chen, S.-H. Wu, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987) 2812.
- [11] A. L. Margolin, J.-Y. Crenne, A. M. Klibanov, *Tetrahedron Lett.* **28** (1987) 1607.
- [12] G. Gil, E. Ferre, A. Meou, J. Le Petit, C. Triantaphylides, *Tetrahedron Lett.* **28** (1987) 1647.
- [13] T. M. Stokes, A. C. Oehlschlager, *Tetrahedron Lett.* **28** (1987) 2091.
- [14] H. Hemmerle, H.-J. Gais, *Tetrahedron Lett.* **28** (1987) 3471.
- [15] A. Belan, J. Bolte, A. Fauve, J. G. Gourcy, H. Veschambre, *J. Org. Chem.* **52** (1987) 256.
- [16] P. E. Sonnet, *J. Org. Chem.* **52** (1987) 3477.
- [17] F. Francalanci, P. Cesti, W. Cabri, D. Bianchi, T. Martinengo, M. Foa, *J. Org. Chem.* **52** (1987) 5079.
- [18] a) K. Yamamoto, T. Nishioka, J. Oda, Y. Yamamoto, *Tetrahedron Lett.* **29** (1988) 1717; b) D. Bianchi, P. Cesti, E. Battistel, *J. Org. Chem.* **53** (1988) 5531.
- [19] a) Y.-F. Wang, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **53** (1988) 3127; b) Y. F. Wang, J. J. Lalonde, M. Momongan, D. E. Bergbreiter, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 7200; c) Y. Terao, M. Murata, K. Achiwa, T. Nishio, M. Akamatsu, M. Kamimura, *Tetrahedron Lett.* **29** (1988) 5173.
- [20] F. Theil, S. Ballschuh, H. Schick, M. Haupt, B. Hafner, S. Schwarz, *Synthesis* **1988**, 540.
- [21] J. B. West, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **28** (1987) 1629.
- [22] A. L. Margolin, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987) 3802.
- [23] I. L. Gatfield, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **434** (1984) 569.

- [24] A. Makita, T. Nihira, Y. Yamada, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 805.
- [25] Z.-W. Guo, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 1999.
- [26] W. Kullman: *Enzymatic Peptide Synthesis*, CRC Press, Boca Raton, FL 1987.
- [27] J. Grundwald, B. Wirtz, M. P. Scollar, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 6732.
- [28] R. Z. Kazandjian, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 5448.
- [29] F. Effenberger, T. Ziegler, S. Förster, *Angew. Chem.* 99 (1987) 491; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 458.
- [30] A. M. Snijder-Lambers, H. J. Doddema, H. J. Grande, P. H. van Lelyveld, *Biocatal. Org. Media Proc. Int. Symp.* 1986, 87, siehe *Stud. Org. Chem. (Amsterdam)* 29 (1987).
- [31] P. L. Luisi, *Angew. Chem.* 97 (1985) 449; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 439.
- [32] T. W. Randolph, H. W. Blanch, J. M. Praunitz, C. R. Wilke, *Biotechnol. Lett.* 7 (1985) 325.
- [33] H. L. Bruckman in B. Borgström, H. L. Brockman (Hrsg.): *Lipases*, Elsevier, Amsterdam 1984, S. 3.
- [34] L. E. S. Brink, J. Tramper, *Biotechnol. Bioeng.* 27 (1985) 1258.
- [35] C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger, *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1987) 81.
- [36] G. Carrea, *Trends Biotechnol.* 2 (1984) 102.
- [37] L. G. Butler, *Enzyme Microb. Technol.* 1 (1979) 253.
- [38] M. W. Empie, A. Gross, *Annu. Rep. Med. Chem.* 23 (1988) 305.
- [39] G. A. Homandberg, J. A. Mattis, M. Laskovski, Jr., *Biochemistry* 17 (1978) 5220.
- [40] R. Dernoncour, R. Azerad, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 4661.
- [41] F. Bjorkling, J. Boutelej, J. Gatenbeck, S. Hult, T. Norin, *Tetrahedron Lett.* 26 (1985) 4957.
- [42] L. K. P. Lam, R. A. H. F. Hui, J. B. Jones, *J. Org. Chem.* 51 (1986) 2047.
- [43] F. Bjorkling, J. Boutelej, M. Hjalmarsson, K. Hult, T. Norin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1987, 1041.
- [44] D. Herschlag, *Bioorg. Chem.* 16 (1987) 62.
- [45] A. P. G. Kieboom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 107 (1988) 347.
- [46] Y. Hata, Y. Matsuura, N. Tanaka, M. Kakudo, A. Sugihara, M. Iwai, Y. Tsujisaka, *J. Biochem.* 86 (1979) 1821.
- [47] Y. Hata, N. Tanaka, N. Kakudo, A. Sugihara, M. Iwai, Y. Tsujisaka, *Acta Crystallogr. Sect. A* 37 (1981) C38.
- [48] M. Séméria, P. Desnuelle, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 48 (1979) 360.
- [49] W. H. Liu, T. Beppa, K. Arima, *Agrie. Biol. Chem.* 41 (1977) 131.
- [50] R. Verger, M. C. F. Mieras, G. H. DeHaas, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 4023.
- [51] J. Lavayre, J. Verrier, J. Baratti, *Biotechnol. Bioeng.* 24 (1982) 2175.
- [52] C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 7294.
- [53] A. R. Fersht: *Enzyme Structure and Mechanism*, 2. Aufl., Freeman, New York 1985, Kap. 12.
- [54] A. Zaks, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 3192.
- [55] W. W. Cleland, *Biochemistry* 14 (1975) 3220.
- [56] G. Langrand, J. Baratti, G. Buono, C. Triantaphylides, *Biocatalysis* 1 (1988) 231.
- [57] P. Aldercreutz, B. Mattiasson, *Biocatalysis* 1 (1987) 99.
- [58] M. V. Rodionova, A. B. Belova, V. V. Mozhaev, K. Martinek, I. V. Berezin, *Dokl. Akad. Nauk USSR* 292 (1987) 913; *Chem. Abstr.* 106 (1987) 171823.
- [59] A. Zaks, A. M. Klibanov, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 3194.
- [60] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, *Chem. Rev.* 71 (1971) 525.
- [61] C. Laane, S. Boeren, R. Hilhorst, C. Veeger, *Biocatal. Org. Media Proc. Int. Symp.* 1986, 65, siehe *Stud. Org. Chem. (Amsterdam)* 29 (1987).
- [62] C. Laane, *Biocatalysis* 1 (1987) 17.
- [63] K. Martinek, A. N. Semenov, I. V. Berezin, *Biochim. Biophys. Acta* 658 (1981) 76.
- [64] C. Gancet, C. Gaignard, P. Fourmentreux, *Eur. Pat.-Anm.* 239470.A1 (1987); *Chem. Abstr.* 108 (1988) 73 744d.
- [65] M. Reslow, P. Adlercreutz, M. Mattiasson, *Biocatal. Org. Media Proc. Int. Symp.* 1986, 349, siehe *Stud. Org. Chem. (Amsterdam)* 29 (1987).
- [66] A. M. Klibanov, *CHEMTECH* 1986, 354.
- [67] H. Hirohara, S. Mitsuda, E. Ando, R. Komaki, *Biocatal. Org. Synth. Proc. Int. Symp.* 1985, 119, siehe *Stud. Org. Chem. (Amsterdam)* 22 (1985).
- [68] C. S. Chen, C. J. Sih, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [69] C. J. Sih, S. H. Wu, *Top. Stereochem.* 19 (1989), im Druck.
- [70] C.-S. Chen, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [71] D. V. Patel, F. Van Middlesworth, J. Donaubauer, P. Gannett, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 4603.
- [72] G. M. Ramos Tombo, H.-P. Schaer, X. Fernandez I Busquets, O. Ghisalba: *Biocatal. Org. Media Proc. Int. Symp.* 1986, 43, siehe *Stud. Org. Chem. (Amsterdam)* 29 (1987).
- [73] Z. W. Guo, T. K. Ngooi, A. Scilimati, G. Fülling, C. J. Sih, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 4927.
- [74] A. Scilimati, T. K. Ngooi, C. J. Sih, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 5583.
- [75] A. L. Gutman, K. Zuobi, A. Boltansky, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 3861.
- [76] L. Bianco, E. Buigé-Jampel, G. Rousseau, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 1915.
- [77] Z. W. Guo, C. J. Sih, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [78] V. Gotor, R. Brieva, F. Rebollodo, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1988, 957.
- [79] P. D. Theisen, C. H. Heathcock, *J. Org. Chem.* 53 (1988) 2374.
- [80] B. Borgström, C. E. Albertsson in B. Borgström, H. L. Brockman (Hrsg.): *Lipases*, Elsevier, Amsterdam 1984, S. 151.