

**Struktur der *Mucor miehei*-Lipase in der offenen Form.**  
Wie alle bisher strukturell untersuchten Lipasen weist sie das von den Serin-Proteasen her bekannte „ $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungsmotiv“ auf. Bei geöffnetem „Deckel“ ist die katalytische Triade im aktiven Zentrum (rot) für ein Substrat (normalerweise Triglyceride) zugänglich.

# Lipasen: Grenzflächen-Enzyme mit attraktiven Anwendungen

Rolf D. Schmid\* und Robert Verger

Lipasen hydrolyseren nicht nur Fette im Verdauungstrakt, sie können auch dazu verwendet werden, Triglyceride im technischen Maßstab umzustellen. Überhaupt sind sie überraschend vielseitige Biokatalysatoren, die eine große Zahl synthetischer Substrate acylieren oder deacylieren können. Handelt es sich dabei um prostereogene oder racemische Verbindungen, so verlaufen die Reaktionen häufig mit hoher Enantioselektivität. Liegen mehrere acylierbare oder deacylierbare funktionelle Gruppen vor, ist die Lipase-Katalyse meist hoch regioselektiv. Da Lipasen außerdem recht stabil sind und in guten Ausbeuten aus Pflanzen, tierischem Gewebe und vor allem aus

natürlichen oder gentechnisch veränderten Mikroorganismen gewonnen werden können, haben sie bereits vielfältige Anwendungen gefunden. So werden sie Waschmitteln zugesetzt und bei der Papiererzeugung sowie der Herstellung von Käsearoma verwendet. Ferner kommen sie in der Fettchemie und zunehmend auch in der Synthese zum Einsatz. Unter enzymologischen Gesichtspunkten sind Lipasen ebenfalls sehr interessant: Sie weisen eine ungewöhnliche räumliche Struktur auf, bei der das katalytisch aktive Zentrum nur in Gegenwart des Lipid-„Supersubstrats“ zugänglich ist (was wahrscheinlich auch bei Reaktionen in organischen Lösungsmitteln

gilt). In den letzten Jahren haben mehrere europäische Forschungsprojekte eine Fülle an Informationen über die Struktur und die Funktion von Lipasen geliefert, die es ermöglichte, diese interessanten Enzyme durch Gentechnik und Protein-Design für praktische Anwendungen weiter zu verbessern. Schließlich spielen Lipasen bei Tier und Mensch eine wichtige Rolle bei der Fettverdauung: Lipasehaltige Substitutionspräparate und Lipase-Inhibitoren haben deshalb auch pharmakologische Bedeutung.

**Stichwörter:** Acylierungen • Enzymkatalyse • Industrielle Chemie • Lipasen • Metabolismus

## 1. Einleitung

Lipide sind Grundbausteine in der Chemie des Lebens. Die meisten Organismen nutzen die supramolekularen Eigenschaften der Phospholipide, um sich durch die Bildung von Membranen gegen die Umwelt abzugrenzen und innerzelluläre Kompartimente aufzubauen. Pflanzen und Tiere können chemische Energie unter anderem in Form von Triglyceriden speichern. Enzyme, die wasserunlösliche Triglyceride an der Grenzfläche Wasser/Öl hydrolyseren, bezeichnet man als Triacylglycerin-Hydrolasen [EC 3.1.1.3] oder vereinfacht als Lipasen.<sup>[1]</sup> Enzyme, die Phospholipide spalten, heißen Phos-

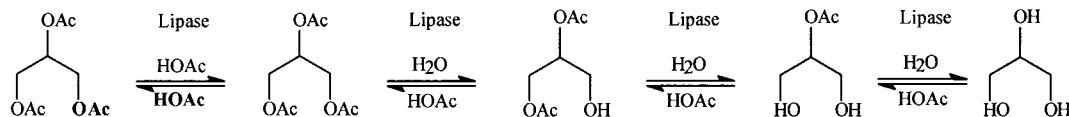
[\*] Prof. Dr. R. D. Schmid  
Institut für Technische Biochemie der Universität  
Allmandring 31, D-70569 Stuttgart  
Fax: (+49) 711-685-3196  
E-mail: Rolf.D.Schmid@rus.uni-stuttgart.de

Dr. Robert Verger  
Laboratoire de Lipolyse Enzymatique  
Centre de Biochimie et Biologie Moléculaire, CNRS  
Chemin Joseph Aiguier, BP 71  
F-13402 Marseille Cedex 9 (Frankreich)  
Fax: (+33) 9-1220875  
E-mail: verger@ir2cbm.cnrs-mrs.fr

pholipasen (verschiedene Einträge unter [EC 3.1.x]), solche, die wasserlösliche Ester spalten, Esterasen [EC 3.1.1.1].

Phospholipasen und Lipasen wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht.<sup>[2-13]</sup> Phospholipasen spielen vor allem beim Um- und Abbau von Membranen sowie bei der Signaltransduktion eine wesentliche Rolle, auf die aber hier nicht näher eingegangen werden soll. Lipasen haben dagegen vielfältige Funktionen im Stoffwechsel von Nahrungs- und Speicherfetten und damit auch ein pharmakologisches Potential; so werden Lipasen bereits als Substitutionspräparate bei Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse eingesetzt. Ebenso interessant sind die breiten Anwendungsmöglichkeiten von Lipasen in der Biotechnologie vor allem als Waschmittelenzyme und als Katalysatoren für chemische Umsetzungen. Sie dienen zur Gewinnung von Spezialitäten aus Fetten und Ölen, und durch Variation der Reaktionsbedingungen sind sie ebenso für Hydrolysereaktionen wie für Estersynthesen geeignet (Schema 1).

Auch für die Organische Chemie sind Lipasen von großem Wert, da sie im Unterschied zu den meisten anderen Enzymen in organischen Lösungsmitteln erstaunlich stabil sind und zudem eine ungewöhnlich breite Substratspezifität aufweisen: Sie setzen eine große Zahl aliphatischer, alicyclischer,



Schema 1. Hydrolyse und Estersynthese mit Lipase.

bicyclischer, aromatischer und metallorganischer Ester um und weisen gegenüber racemischen Estern oder Verbindungen mit mehreren Hydroxyfunktionen meist eine hohe Enantio- bzw. Regioselektivität auf.<sup>[14]</sup> Das bei der Lipase-Katalyse intermediär gebildete Acylenzym kann seine Acylgruppe aber nicht nur auf Hydroxyverbindungen übertragen, sondern auch auf andere Nucleophile, wie auf die Thiogruppe eines Thioesters oder auf aktivierte Amine.<sup>[15]</sup> Als Folge des großen Synthesepotentials von Lipasen gibt es über ihren Einsatz in der organischen Synthese umfangreiche Literatur, die auch deshalb weiter zunimmt, weil Lipasen in wachsender Zahl als Handelsprodukte und in „Test-Kits“ angeboten werden.

## 2. Vorkommen, Herstellung und Analytik

### 2.1. Vorkommen und Herstellung

Lipasen sind weit verbreitete Enzyme, die in vielen Mikroorganismen<sup>[16–18]</sup> und in nahezu allen Pflanzen<sup>[19, 20]</sup> und Tieren<sup>[21, 22]</sup> vorkommen. Man gewinnt sie durch Extraktion von pflanzlichem oder tierischem Gewebe oder durch Kultivierung von Mikroorganismen.<sup>[2]</sup> Die meisten kommerziell erhältlichen Lipasen sind mikrobielle Enzyme. Ferner werden Lipasen aus Magen- und Pankreasextrakten angeboten. Mit dem Einzug der Gentechnik in die Enzymproduktion wächst auch die Zahl der kommerziell angebotenen rekombinannten

Lipasen. Beispielsweise wird eine „Waschmittel-Lipase“ aus dem Pilz *Humicola lanuginosa* im technischen Maßstab von mehreren 100 Tonnen durch Fermentation des Schimmelpilzes *Aspergillus oryzae* hergestellt, in den das die Lipase codierende Gen aus *Humicula* kloniert wurde.<sup>[23]</sup>

Die Isolierung von reinen Lipasen aus derartigen Fertigungsansätzen ist aufwendig, denn meist sind sie nur eine der Komponenten eines hydrolytisch wirksamen Enzym-Cocktails, den ein Organismus zur Aufrechterhaltung seines Stoffwechsels produziert. Technische Präparate enthalten daher häufig noch weitere aktive Enzyme und müssen durch aufwendige Reinigungsverfahren von begleitenden Esterasen und Proteasen befreit werden (Tabelle 1).<sup>[24, 25]</sup> Diese reichern sich nicht nur an der Grenzfläche Wasser/Ol an, sondern an den Grenzflächen aller Phasen mit geringerer Polarität als Wasser (z. B. an unpolaren organischen Lösungsmitteln, Glas- und Plastikoberflächen und Luftblasen) und können dort leicht irreversibel adsorbieren und denaturieren.<sup>[26, 27]</sup>

Bei der Bewertung von Laborversuchen mit kommerziellen Lipasen müssen deshalb strenge Maßstäbe an den Reinheitsgrad des Enzyms angelegt werden, die nicht nur die taxonomische Einordnung des zur Produktion verwendeten Mikroorganismus, sondern auch das Aufarbeitungsverfahren berücksichtigen (Tabelle 2). Zudem bilden viele Mikroorganismen ein Gemisch isoformer Lipasen, die in einem technischen Präparat vorliegen. Sie können sich nicht nur marginal voneinander unterscheiden (z. B. durch ihr Glycosylierungsmuster<sup>[28]</sup>), sondern auch sehr unterschiedliche

*Rolf D. Schmid, geboren 1942 in Salzburg, studierte ab 1961 Chemie an der Universität München und später in Freiburg, wo er 1970 bei Hans Grisebach promovierte. Nach Postdoc-Aufenthalten in Frankreich und den USA arbeitete er von 1972 bis 1987 in den Forschungslaboreien der Henkel KGaA in Düsseldorf, zuletzt als Abteilungsdirektor der Biotechnologischen Laboratorien. Von 1987 bis 1993 war er Bereichsleiter für Enzymtechnologie und Naturstoffchemie bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig. 1993 wurde er als Leiter des Instituts für Technische Biochemie der Universität nach Stuttgart berufen. Er führt weiterhin die Abteilung „Molekulare Biotechnologie“ am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik in Stuttgart und ist Vorsitzender des IUPAC Committee on Biotechnology.*

*Robert Verger wurde 1944 in Maison Carrée, Algerien, geboren. Er studierte ab 1962 Chemie an der Universität Aix-Marseille und promovierte dort 1970 im Fach Physik bei Pierre Desnuelle. Nach einem Postdoc-Aufenthalt in Utrecht ging er nach Marseille an das Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). Seit 1990 ist er dort Directeur de Recherche 1<sup>ère</sup> classe und erhielt die Bronze- und Silbermedaille des CNRS.*



R. Verger

R. D. Schmid

Tabelle 1. Reinheit handelsüblicher Lipasen: Viele sind nicht rein.

Lipase aus	Proteinanteil [%]	Lipase Aktivität <sup>[a]</sup> [U mg <sup>-1</sup> ]	hauptsächliche SDS-PAGE-Banden [kDa]	Zahl der hauptsächlichen SDS-PAGE-Banden	Zahl der Esterase-Banden <sup>[b]</sup>	Protease-Aktivität <sup>[c]</sup> [%]
<i>Rhizomucor miehei</i>	3.5	16	25	5	2	1
<i>Rhizopus spec.</i>	4.8	32	43, 67	10	4	3
<i>Humicola lanuginosa</i>	2.9	10	20, 30	4	2	20
<i>Candida rugosa I</i>	4.2	11	20, 30, 43, 67, 90	13	2	< 1
<i>Candida rugosa II</i>	6.4	14	43, 67	11	2	< 1
<i>Geotrichum candidum</i>	4.3	8	67	3	0	< 1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1.2	30	14, 25, 40, 43	6	3	< 1
<i>Chromobacterium viscosum I</i>	1.1	45	17, 30, 40	3	1	0
<i>Chromobacterium viscosum II</i>	9.5	154	17, 30, 40	2	1	12

[a] Gegen Triolein (pH 7.5; 37 °C). [b] Hydrolyse in Gegenwart von  $\alpha$ -Naphthylacetat und Färbung mit FastRed. [c] Als Prozent Hydrolyse von Azoalbumin im Vergleich zu Proteinase K.

Tabelle 2. Taxonomische Besonderheiten bei der Zuordnung einiger Lipasen.

Herkunft der Lipase (Abkürzung)	Bemerkung
<i>Candida rugosa</i> (CRL)	Ein Organismus, der bis 1992 als <i>Candida cylindracea</i> klassifiziert wurde. Die Reinigung des Enzyms und seine Klönierung ergab, daß mindestens fünf nahe verwandte Isoformen gebildet werden.
<i>Geotrichum candidum</i> (GCL)	Enthält zwei Isoformen mit unterschiedlicher Spezifität gegenüber $\Delta^9$ -ungesättigten Fettsäuren.
<i>Rhizopus</i> (RAL, ROL, RDL, RNL)	Obwohl Literaturdaten unterschiedliche Substratspezifitäten der Lipasen aus <i>R. arrhizus</i> , <i>R. oryzae</i> , <i>R. delemar</i> und <i>R. niveus</i> suggerieren, ergab sich bei der Klönierung und Sequenzierung dieser Enzyme eine nahezu 100proz. Identität.
<i>Penicillium camembertii</i> (PeCL)	Bis 1990 als Lipase aus <i>P. cyclopium</i> klassifiziert. Enthält vier Isoformen, die sich nur in ihrem Glycosylierungsmuster unterscheiden.
<i>Pseudomonas glumae</i> (PGL)	Die Klönierung und Sequenzierung des Enzyms ergab eine 100proz. Identität mit dem Enzym aus <i>Chromobacterium viscosum</i> (CVL).
<i>Pseudomonas cepacia</i> (PCL)	Seit 1995 als <i>Burkholderia cepacia</i> klassifiziert. Die Klönierung und Sequenzierung ergab ferner eine 100proz. Übereinstimmung mit dem Enzym aus <i>P. sp.</i> ATCC21808 (PSL).

Eigenschaften aufweisen, beispielsweise nach partieller Proteolyse während der Aufarbeitung in Gegenwart von Proteasen oder nach autolytischer Bildung aus einem Proenzym.

Daraus folgt, daß die vor allem in der organisch-chemischen und fettchemischen Literatur beschriebenen Versuche mit „Lipasen“ mit Vorsicht zu bewerten sind, da als Enzymquelle häufig unzulänglich charakterisierte kommerzielle Enzym-Cocktails verwendet wurden, die neben anderen Enzym-Aktivitäten auch eine Lipase enthielten. Bei systematischen Untersuchungen mit Lipasen sollte deshalb auf eine sorgfältige Reinheitsprüfung des Enzyms mit konventionellen Methoden der Biochemie größter Wert gelegt werden, um bei den Ergebnissen Maskierungseffekte ausschließen zu können. Glücklicherweise wächst die Zahl der am Markt erhältlichen reinen Lipase-Präparate stetig; mehrere werden bereits gentechnisch hergestellt, wodurch auch das

Vorliegen eines Gemisches isoformer Enzyme ausgeschlossen werden kann. Die wichtigsten kommerziell erhältlichen Lipasen, ihre Spezifität und die Hauptanwendungen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt; die hier verwendeten Abkürzungen gelten auch für den weiteren Text.

## 2.2. Analytische Bestimmung

Lipasen werden meist anhand ihrer hydrolytischen Wirkung auf Triglyceride in einem heterogenen Reaktionsmedium Wasser/Öl charakterisiert. Bei der Durchführung und Interpretation dieser kinetischen Messungen ist größte Sorgfalt erforderlich, denn der Zusatz oder die Bildung amphiphiler Bestandteile verändert die Grenzfläche und wirkt häufig auch direkt auf das Enzym. Manche Lipasen – z.B. gastrische Lipase – werden in einer Wasser/Tributyrin-Emulsion schnell an der Grenzfläche inaktiviert, so daß ihre Grenzflächenaktivierung mit Substraten dieses Typs nicht bestimmt werden kann. Verwendet man partiell wasserlösliche Ester zur Aktivitätsbestimmung, so können sich auf der Oberfläche der Gasblasen, die durch intensives Rühren des heterogenen Reaktionsmediums entstehen, monomolekulare Adsorptionsfilme bilden. Dieser Vorgang ist die Hauptursache für die großen Abweichungen bei kinetischen Messungen mit mechanisch gerührten und ungerührten Lösungen. Zusammenfassend kann man sagen, daß die „Qualität der Grenzfläche“, als Grenzflächenspannung meßbar, der wesentliche Faktor für den Umgang mit Lipasen und deren analytische Bestimmung ist.<sup>[29–31]</sup> Unglücklicherweise bedeutet das, daß relevante Vergleiche von Datensätzen nur möglich sind, wenn die Bestimmungen unter strikt identischen Bedingungen, vorzugsweise im gleichen Labor, durchgeführt werden. Aktivitätsbestimmungen kommerzieller Hersteller können deshalb in der Regel nicht miteinander verglichen werden. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die wichtigsten Methoden zur Lipase-Bestimmung.

## 2.3. Wechselwirkung von Lipasen mit Lipiden

Eine enzymatische Aktivität von Lipasen gegenüber Fetten ist nur in Gegenwart einer Grenzfläche möglich. Lipasen sind

Tabelle 3. Wichtige Lipasen.

Herkunft	Code <sup>[a]</sup>	M [kDa] (gerundet)	Spezifität (Bemerkungen)	Anwendungsgebiete
<b>aus Mensch und Säugern</b>				
humane Pankreas-Lipase	HPL	50	<i>sn</i> -1,3	
humane gastrische Lipase	HGL	50	<i>sn</i> -3 (säurestabil)	
Schweine-Pankreas-Lipase	PPL	50	<i>sn</i> -1,3	organische Synthese, Verdauungsenzym
Meerschweinchen- Pankreas-Lipase	GPL-RP2	48	<i>sn</i> -1,3 (Phospholipase-A1-Aktivität)	
<b>aus Pilzen</b>				
<i>Candida rugosa</i>	CRL	60	unspezifisch	organische Synthese
<i>Candida antarctica B</i>	CAL	60	<i>sn</i> -1,3	organische Synthese
<i>Geotrichum candidum</i>	GCL	60	<i>cis</i> -Δ <sup>9</sup> (ungesättigte Fettsäuren)	Fettchemie
<i>Humicola lanuginosa</i>	HLL	30	unspezifisch	Waschmittel
<i>Rhizomucor miehei</i>	RML	30	<i>sn</i> -1,3	Käseherstellung
<i>Aspergillus oryzae</i>	AOL			Käseherstellung
<i>Penicillium camembertii</i>	PEL	30	<i>sn</i> -1,3	Monoglyceride
<i>Rhizopus delemar,</i> <i>oryzae, arrhizus</i>	RDL	41	<i>sn</i> -1,3 (Phospholipase-A1-Aktivität)	Fettchemie
<b>aus Bakterien</b>				
<i>Pseudomonas glumae</i>	PGL	33	unspezifisch	Waschmittel, organische Synthese
<i>Burkholderia cepacia</i>	PCL	33	unspezifisch	organische Synthese
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	PPL	33	<i>sn</i> -1,3	Waschmittel
<i>Pseudomonas mendocina</i>	PML	33	<i>sn</i> -1,3	Waschmittel
<i>Chromobacterium viscosum</i>	CVL	33	<i>sn</i> -1,3	organische Synthese
<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	BTL-2	43	<i>sn</i> -1,3 (thermoalkalophil)	
<i>Fusarium solani</i> (hydrolysiert Cutin)	FSL	22		Waschmittel

[a] Andere in diesem Beitrag verwendete Abkürzungen für Lipasen: PSL (*Pseudomonas-species*-Lipase), PFL (*Pseudomonas-fluorescens*-Lipase), HLL (Lipoprotein-Lipase, Mensch), LPL (Lipoprotein-Lipase). Lipasen können kommerziell von zahlreichen Anbietern bezogen werden. Wichtige Hersteller von Lipasen sind: Novo-Nordisk, Baegsvard (Dänemark), Genencor International B.V., Delft (Niederlande), Boehringer-Mannheim, Mannheim, und Amano Co., Nagoya (Japan).

Tabelle 4. Analytische Methoden zur Lipase-Bestimmung.<sup>[16]</sup>

Methode	Prinzip	Vorteile	Nachteile
pH-Stat	potentiometrische Bestimmung der bei der Hydrolyse freigesetzten Fettsäuren	• kontinuierliche kinetische Methode, Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit	• teures Gerät • die erforderlichen Lösungsvermittler können die Reaktionskinetik beeinflussen • bei Lipasen mit saurem pH-Optimum nicht einsetzbar • keine kinetischen Daten
Rücktitration	Rücktitration der freigesetzten Fettsäuren nach definierter Reaktionszeit	• einfach	• nichtnatürliche Substrate
Kolorimetrie	Freisetzung einer farbigen Reportergruppe aus einem hydrolysierbaren Ester, z.B. <i>p</i> -Nitrophenylpalmitat oder Dilaurylglycerin-Resorufinester	• schnelle und automatisierbare kinetische Bestimmungen	
Bestimmung der Hydrolyse monomolekularer Lipidfilme auf Wasser	Hydrolyse einer Triglycerid-Monoschicht auf Wasser bei konstantem Oberflächendruck mit kontinuierlicher Nachlieferung des Substrats („zero-order trough“; Abb. 1)	• kinetische Bestimmungen ohne Zusatz von Emulgatoren und mit kontrollierter „Qualität der Grenzfläche“	• teure Ausrüstung • zeitlich aufwendig • experimentell nicht einfach

deshalb ein nützliches Modell für Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen Proteinen und Lipiden.<sup>[34-37]</sup> Die meisten Untersuchungen zu Oberflächeneigenschaften von Lipasen beruhen auf der Monolayer-Technik, bei der entweder gleichzeitig oder nacheinander die Enzymaktivität, die an der Monoschicht adsorbierte Proteinnmenge und die damit einhergehenden Änderungen der Oberflächenspannung bestimmt werden (Abb. 1). Als Kontrolle und um die Unter-

schiede zu Lipasen herauszuarbeiten dienten einige nicht enzymatisch aktive Proteine. Wurden zwitterionische Tenside verwendet, nahm mit zunehmender Oberflächenspannung sowohl die Menge der an die Monoschicht bindenden Pankreas-Lipase wie auch die der Kontrollproteine (Rinderserumalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin A) ab. Bei Verwendung nichtionischer Tenside verhielten sich Pankreas-Lipase und die Kontrollproteine ebenfalls gleich, ihre Bindung an die

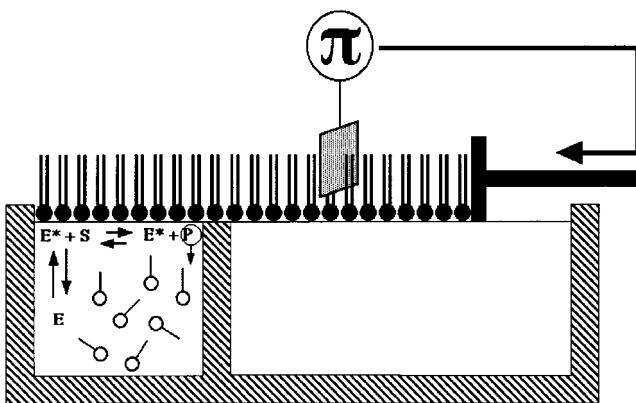


Abb. 1. Darstellung einer „Zero-order-trough“-Apparatur, einer Langmuir-Blodgett-Filmwaage, die aus einem Substratreservoir und einer Reaktionskammer besteht, in der sich das Enzym befindet. Die Kompartimente, beide mit einem monomolekularen Lipidfilm bedeckt, sind durch einen engen in die Glasoberfläche geätzten Kanal miteinander verbunden. Die Oberflächenspannung des Films wird mit der Oberflächen-Barostat-Methode automatisch konstant gehalten.<sup>[32]</sup> Vollautomatische Geräte dieses Typs sind kommerziell erhältlich (KSV, Helsinki, Finnland) und haben zahlreiche Vorteile: a) Mit einer geringen Menge an Lipid kann man physikochemische Parameter wie Oberflächenspannung, Oberflächenpotential, Fläche usw. bestimmen. b) Im Unterschied zu analytischen Bestimmungsmethoden in Lösung kann man aus der wässrigen Subphase monomolekulare Filme abziehen und übertragen. c) Man erhält genaue kinetische Messungen mit geringen Substanzmengen bei geringer Störung des Versuchssystems durch Mischeffekte. d) Die Hemmung der Lipase durch wasserunlösliche Analogverbindungen kann ohne Zusatz synthetischer, oft nichtphysiologischer Tenside exakt bestimmt werden.<sup>[33]</sup>

Monoschicht war aber unabhängig von der vorgegebenen Oberflächenspannung. Die Aktivität von Lipasen wurde auch in Gegenwart einiger Proteine mit Monoschichten von Didecanoyleglycerin bestimmt, wobei entweder die Größe der Oberfläche oder die Oberflächenspannung konstant gehalten wurden. Je nach Wahl des Tensids und der Lipase wurden dabei sehr unterschiedliche Hemmungen der Enzymaktivität beobachtet, und eine Hemmung war immer korreliert mit einer Abnahme der Lipase-Konzentration an der Monoschicht. Die Fähigkeit verschiedener Proteine, die Lipase-Aktivität zu hemmen, hing ab a) von ihrer Konzentration in der Subphase im Vergleich zur Lipase-Konzentration und b) von ihrer Penetrationsfähigkeit (gemessen als Anfangsgeschwindigkeit der Zunahme der Oberflächenspannung bei einem Ausgangswert von  $20 \text{ dyn cm}^{-1}$ ). Daß selbst bei niedriger Proteindichte an der Oberfläche schon eine Hemmung der Lipase-Aktivität eintrat, legt eher einen indirekten Mechanismus nahe.<sup>[34]</sup> Es wird auch vermutet, daß Änderungen im Aufbau des hydrophoben Bereichs von Monoschichten die Adsorption von Lipasen stark beeinflußt.

### 3. Struktur und Mechanismus

Was genau ist eine „Lipase“? 1958 beschrieben Sarda und Desnuelle Lipasen im Sinne einer kinetischen Definition, für die sie das für Lipasen typische Phänomen der „Grenzflächenaktivierung“ heranzogen.<sup>[38]</sup> Sie stellten fest, daß Lipasen gegenüber nichtassoziierten Substraten nur eine geringe Aktivität aufweisen, die oberhalb der kritischen

Micellenkonzentration des Substrats steil ansteigt. Lipasen benötigen zur Aktivierung also ein „Supersubstrat“, aggregierte Moleküle, wie sie in einer Emulsion oder einer mikellaren Lösung vorliegen. Die Proteinstruktur, die dieser Eigenschaft zugrunde liegt, war bis vor wenigen Jahren unbekannt. Erst 1990 konnten die beiden ersten Lipasestrukturen durch Röntgenstrukturanalyse gelöst werden.<sup>[39, 40]</sup> Sie legten einen einzigartigen Mechanismus nahe: Die „Grenzflächenaktivierung“ der Lipasen beruht auf einem amphiphilen Peptidsegment, das wie ein Deckel („lid“, „flap“) das aktive Zentrum des Enzyms bedeckt. Wie zahlreiche Röntgenstrukturanalysen von Lipase-Cokristallen mit Substratanaloga belegen, scheint in Gegenwart einer Grenzfläche dieser Deckel im Zuge einer Konformationsänderung aufzuklappen und dem Substrat damit den Zugang zum aktiven Zentrum zu ermöglichen (Abb. 2).<sup>[41]</sup>

Im Rahmen eines europäischen Lipase-Projekts, an dem sich in den Jahren 1990–1994 24 Laboratorien in 8 Ländern der Europäischen Union beteiligten, wurde allerdings an einer Flut von biochemischen und Strukturdaten hochreiner Lipasen deutlich, daß nicht alle eine Grenzflächenaktivierung zeigen.<sup>[42]</sup> So weisen zwar die Lipasen aus *Pseudomonas glumae*<sup>[43]</sup> und *Candida antarctica* (Typ B),<sup>[44]</sup> deren Tertiärstruktur bekannt ist, eine amphiphile Deckelstruktur auf, aber keine Grenzflächenaktivierung. Bei den Pankreas-Lipasen mit bekannter räumlicher Struktur bilden zwar sowohl die humane Form<sup>[45]</sup> als auch die der Biberratte<sup>[46]</sup> weitgehend homologe amphiphile Deckel (23 Aminosäuren), aber das Biberratten-Enzym zeigt im Unterschied zum Human-Enzym keine Grenzflächenaktivierung, ebensowenig wie die Pankreas-Lipase des Meerschweinchens<sup>[47]</sup> mit einem „Mini-Deckel“ aus 5 Aminosäuren. Daraus muß man leider schließen, daß weder die Beobachtung einer Grenzflächenaktivierung noch die Gegenwart eines amphiphilen Deckels hinreichende Kriterien sind, um eine Esterase als „Lipase“ zu klassifizieren. Das sicherste Merkmal für eine Lipase ist – auch nach über 30 Jahren Lipase-Forschung – noch immer ihre Fähigkeit, langketige Glycerinester zu hydrolyseren.<sup>[29]</sup>

Die 12 Lipasen, deren räumliche Strukturen mittlerweile aufgeklärt wurden, sind der Familie der „ $\alpha/\beta$ -Faltungsmotiv“-Enzyme zuzuordnen – einer Gruppe vor allem von Hydrolasen, deren Architektur aus einer spezifischen Sequenzfolge von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern besteht.<sup>[39, 40, 43, 44, 48–53]</sup> Sie hydrolyseren Esterbindungen mit einer „katalytischen Triade“ aus einem nucleophilen Serin, das durch ein System aus Wasserstoffbrückenbindungen des räumlich benachbarten Histidin- und Aspartat- oder Glutamat-Restes aktiviert wird (Schema 2). Serin-Proteasen („Waschmittel-Proteasen“) weisen einen sehr ähnlichen Mechanismus auf.

Wie erwähnt, ist ein typisches Merkmal der meisten Lipasen ein „Deckel“ aus einer amphiphilen Peptidsequenz, der vermutlich in Abwesenheit einer Grenzfläche oder eines organischen Lösungsmittels den Zugang des Substrats zur katalytischen Triade im aktiven Zentrum verhindert. Röntgenstrukturanalysen mit kovalent gebundenen hydrophoben Inhibitoren wie Alkylphosphonaten und Cycloalkylphosphonaten (kovalente Modelle für den Übergangszustand der Acylierung) oder Alkylsulfonaten (kovalente Modelle für den Übergangszustand der Deacylierung) ergaben, daß erst beim

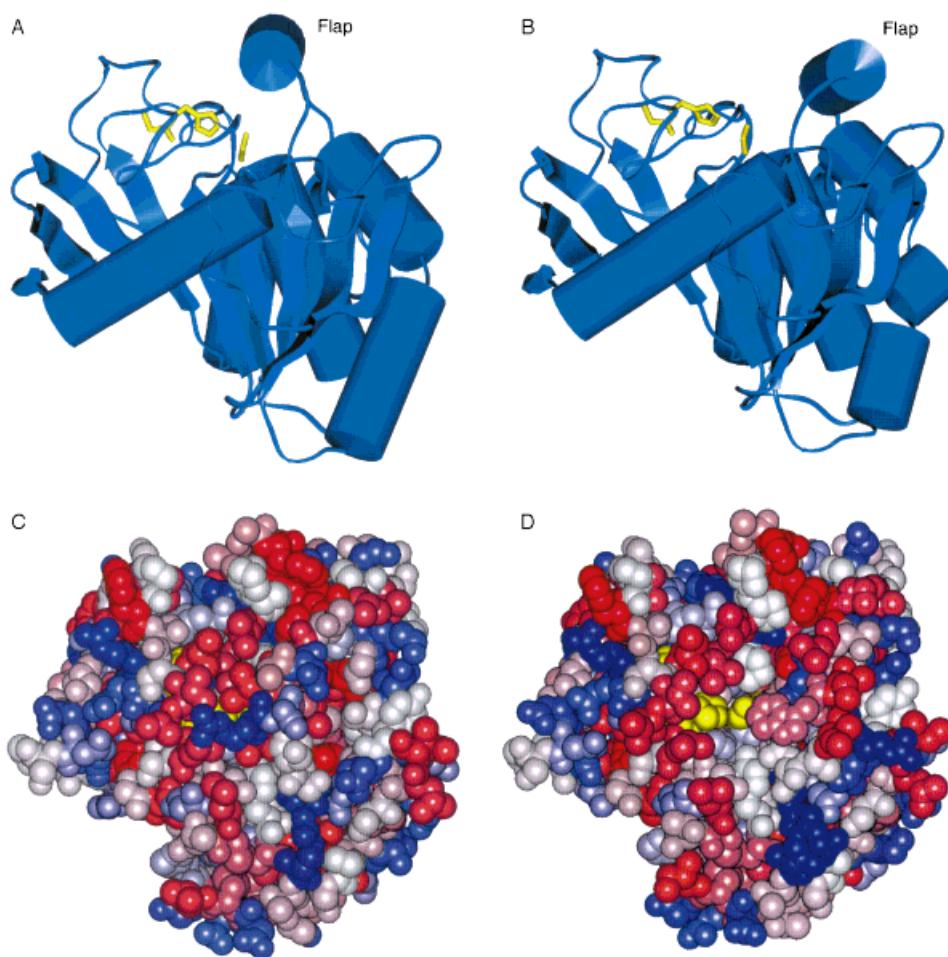
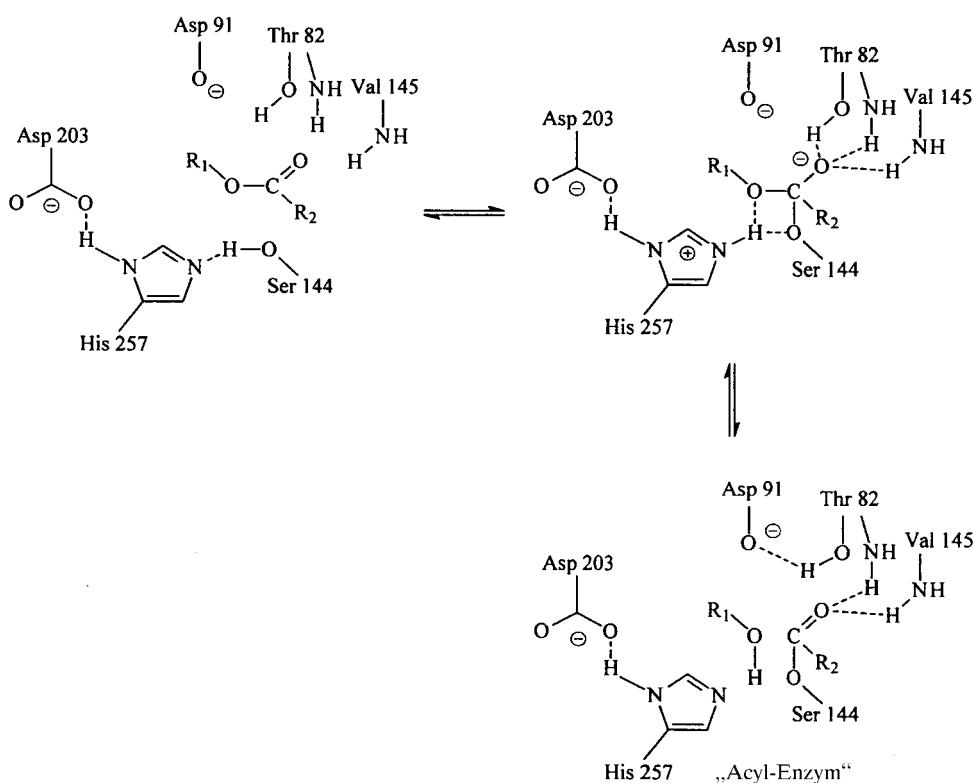


Abb. 2. Struktur der *Mucor miehei*-Lipase in der geschlossenen (A, C) und offenen Form (B, D). A und B (Seitenansicht): Die katalytische Triade (gelb) und sekundäre Strukturelemente zeigen das „ $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungsmotiv“, das typisch für alle Lipasen ist. C und D (Aufsicht): Kalottenmodelle, nach abnehmender Polarität koloriert (dunkelblau – hellblau – weiß – hellrot – dunkelrot). Wenn sich der Deckel öffnet, wird das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade (gelb) zugänglich (D), und der Enzymbereich, der an die Grenzfläche bindet, wird deutlich unpolarer.



Schema 2. Der Katalysemechanismus aller bisher bekannten Lipasen beruht auf einer „katalytischen Triade“ von Serin (als Nucleophil), Histidin und Asparagin- oder Glutaminsäure, die über H-Brücken miteinander verknüpft sind. Der tetraedrische Übergangszustand wird durch eine „Oxyanion-Höhle“ stabilisiert. Die Numerierung in diesem Beispiel beruht auf der Aminosäuresequenz der Lipase aus *Rhizopus oryzae*.

Tabelle 5. Die wichtigsten Strukturmerkmale von Lipasen.<sup>[54, 55]</sup>

Strukturmerkmal	Einzelheiten	Bemerkungen
Der katalytische Mechanismus beruht auf einer „katalytischen Triade“, die aus Serin, Histidin und Asparagin- oder Glutaminsäure besteht.	Keine Ausnahme bei über 30 klonierten Lipasen, auch nicht bei thermo- oder psychrophilen Mikroorganismen; die einzige Varianz besteht im Austausch von Asparagin- gegen Glutaminsäure; Austausch von Serin gegen Cystein durch Mutagenese führt zu stark verminderter Aktivität.	Verwandte Hydrolasen weisen eine erheblich größere Varianz auf; Amidbindungen bei Proteasen und Peptidasen können beispielsweise durch nucleophilen Angriff einer Hydroxy- (Serin, Threonin) oder Thiolgruppe (Cystein) sowie durch den elektrophilen Angriff einer Carboxygruppe (Aspartat/Glutamat) oder eines Metallions ( $Zn^{2+}$ ) hydrolysiert werden.
Konsensus-Sequenz um das „aktive Serin“	Die Konsensus-Sequenz bei über 30 klonierten Lipasen definiert einen „nucleophilen Ellenbogen“ am Ende eines $\beta$ -Faltblatts und besteht aus -Gly/Ala-X-Ser-X-Gly-.	Andere Hydrolasen weisen eine größere Varianz auf.
Die meisten Lipasen haben einen „Deckel“ über dem aktiven Zentrum.	Eine zu einem „Deckel“ geformte amphiphile Peptidsequenz überdeckt im nichtaktivierten Zustand des Enzyms das aktive Zentrum.	In Esterasen oder Proteasen wurde kein „Deckel“ gefunden, aber auch einige Lipasen enthalten keinen oder nur eine sehr kleine Version.
Alle Lipasen gehören zur Familie der „ $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungsmotiv“-Proteine.	Dieser Strukturtyp besteht aus einer Folge hauptsächlich paralleler $\beta$ -Faltblätter, die von $\alpha$ -Helices umgeben sind; das aktive Serin befindet sich an einer Haarnadel-Schleife zwischen einem $\beta$ -Faltblatt und einer $\alpha$ -Helix.	Viele andere Hydrolasen und einige Oxidoreduktasen weisen ähnliche Architektur auf und lassen deshalb eine evolutionäre Verwandtschaft vermuten.

Öffnen dieses Deckels eine große hydrophobe Fläche entsteht, an die das „Supersubstrat“ (normalerweise ein Öltropfen) binden kann.<sup>[54, 55]</sup>

Zusammenfassend kann man feststellen, daß alle bisher untersuchten Lipasen unabhängig vom untersuchten Organismus und bei meist geringer Sequenzhomologie ihrer Peptidkette in ihrer Struktur und Funktion ein hohes Maß an Verwandtschaft aufweisen. Die typischen Strukturmerkmale von Lipasen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Trotz dieser Ähnlichkeiten führen Variationen in der Architektur, z.B. der Substratbindungsstelle oder der Oberfläche, zu erheblichen Unterschieden in den katalytischen Eigenschaften oder der Temperatur- und Lösungsmittelstabilität. Da diese Unterschiede von herausragender Bedeutung für den Einsatz von Lipasen in der organischen Synthese sind, werden sie in Abschnitt 6 gesondert besprochen.

#### 4. Struktur und Funktion von Lipasen des Verdauungstrakts

Pankreas-Lipase (HPL) ist das wichtigste fettpaltende Enzym im menschlichen Verdauungstrakt<sup>[56]</sup> und hat an den gesamten von der Bauchspeicheldrüse sekretierten Proteinen einen Anteil von etwa 3%.<sup>[57]</sup> Es hydrolysiert die primären Estergruppen von Di- und Triglyceriden und bildet dabei 2-Monoglyceride und Fettsäuren, die als Mischmicellen mit Salzen der Gallensäuren die Wände des Verdauungstrakts permeieren. Anders als die meisten anderen Pankreasenzyme wie Trypsin, das als Proenzym sekretiert und durch proteolytische Spaltung im Zwölffingerdarm aktiviert wird, erfolgt die Sekretion der Pankreas-Lipase als aktives Enzym (449 Aminosäuren, Molekulargewicht 50 kDa). Erstaunlicherweise ist Pankreas-Lipase aber inaktiv gegenüber Triglyceriden, wenn diese in micellaren Konzentrationen von Salzen der Gallensäure emulgiert sind. Gallensäuresalze sind amphiphile Moleküle des Verdauungstrakts, die meist an

der Grenzfläche Lipid/Wasser oder als Micellen in Lösung vorkommen. Experimentelle Befunde legen nahe, daß die negativ geladene Oberfläche von Triglycerid-Tröpfchen, die mit Gallensäuresalzen bedeckt sind, die Adsorption und Aktivierung von Pankreas-Lipase verhindern. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wird vom Pankreas ein Ankerprotein sekretiert, die Colipase. Sie bildet einen 1:1-Komplex mit Pankreas-Lipase, der deren Adsorption an die Oberfläche Gallensäure-überzogener Fetttröpfchen ermöglicht.<sup>[45]</sup> Durch die Wechselwirkung mit Colipase weist Pankreas-Lipase also eine hohe Spezifität gegenüber wasserunlöslichen Triglyceriden auf. Lipasen spielen eine wichtige Rolle im Abbau von Fett, und mangelnde Bildung oder Sekretion von Pankreas-Lipase wurde bei Erkrankungen wie Pankreatitis oder cystischer Fibrose beschrieben. Im Rahmen von Enzym-Substitutionstherapien werden bei derartigen Erkrankungen deshalb seit langem Lipasen aus Schweinepankreas und anderen Quellen verabreicht.

Der übermäßige Fettverzehr in den industrialisierten Ländern führt zu Übergewicht als einem wichtigen Risikofaktor. Intakte langketige Triglyceride können im gastrointestinalen Trakt nicht resorbiert werden und tragen deshalb nicht zum Energiehaushalt des Organismus bei. Inhibitoren der Pankreas-Lipase könnten deshalb zur Verhinderung von Übergewicht bei unverändert fettreicher Nahrung eingesetzt werden. Wir werden diese pharmakologischen Aspekte von Pankreas-Lipase und -Inhibitoren in Abschnitt 7 weiter diskutieren.

##### 4.1. Reaktionsmechanismus der humanen Pankreas-Lipase

Die Wechselwirkungen des humanen Pankreas-Lipase-Colipase-Komplexes und ihre Bedeutung für die Grenzflächenkatalyse wurden in molekularer Auflösung untersucht. Nach Röntgenstrukturuntersuchungen von Winkler et al.

besteht humane Pankreas-Lipase aus zwei klar abgegrenzten Domänen: einer großen N-terminalen Domäne aus den Aminosäuren 1–335 und einer kleineren C-terminalen Domäne aus den Resten 336–449 (Abb. 3).<sup>[39]</sup>

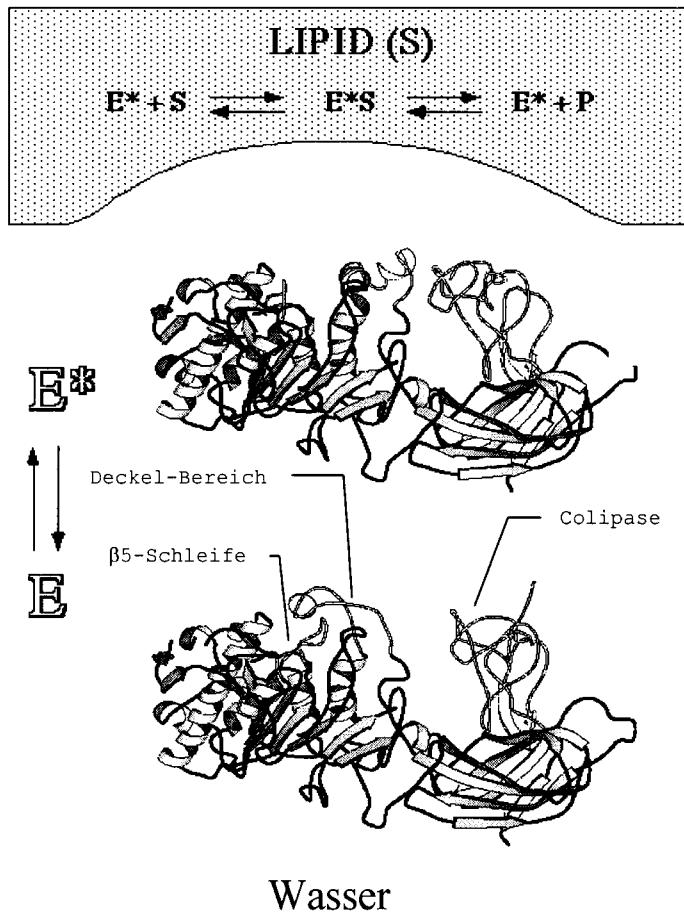


Abb. 3. Struktur des HPL-Procolipase-Komplexes in der geschlossenen (E) und in der offenen Konformation (E\*S). Die beiden Abbildungen zeigen die konformativen Veränderungen am „Deckel“, d.h. in der die Colipase bindenden Region der  $\beta$ 5-Schleife, und die in der Colipase während der Grenzflächenaktivierung des Enzymkomplexes.

Die große N-terminale Domäne weist die typische Struktur eines „ $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungsmotivs“ auf, die von einer zentralen Anordnung paralleler  $\beta$ -Faltblätter dominiert wird.<sup>[39]</sup> Sie enthält das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade, die auch in allen anderen Säuger-Lipasen konserviert ist (z.B. in Lipoprotein- und hepatischer Lipase); bei der HPL besteht sie aus Ser152, Asp176 und His263. Das aktive Zentrum wird von einem Peptid-Deckel abgeschirmt, der zwischen den Disulfidbrücken Cys237 und 261 angeordnet ist. Das „Deckel-Peptid“ enthält eine kurze, einwendelige  $\alpha$ -Helix mit einem Tryptophanrest in Position 252, der vollständig im Inneren des Proteins und direkt über dem Serin-Nucleophil in Position 152 liegt. Nach Untersuchungen der Tryptophan-Fluoreszenz an HPL gehen mit der Acylierung des aktiven Serins durch den Inhibitor Tetrahydrolipstatin **16** (siehe Abb. 14) in Gegenwart von Gallensäuresalz-Micellen starke Veränderungen des Fluoreszenzspektrums einher.<sup>[58]</sup> Die Röntgenstrukturanalyse eines Cokristallitates aus HPL-

Colipase-Komplex in Gegenwart von Phospholipid/Gallen-säure-Salz-Mischmicellen<sup>[45]</sup> und von Monoalkylphosphat-Inhibitor<sup>[59]</sup> ergab ferner, daß sich der „Deckel“ dabei seitlich verschiebt, wodurch das Enzym das aktive Zentrum und eine große hydrophobe Oberfläche exponiert. Vermutlich handelt es sich bei der Bindung des Enzyms an eine hydrophobe Oberfläche und bei seiner Grenzflächenaktivierung um den gleichen Vorgang. Die offene Form des Lipase-Procolipase-Komplexes zeigt, wie Colipase HPL in Gegenwart von Salzen der Gallensäuren an Lipid-Grenzflächen verankert: Colipase bindet an das  $\beta$ -Faltblatt der C-terminalen Domäne der HPL und exponiert dabei mehrere hydrophobe Bereiche an der dieser Bindungsstelle abgewandten Seite; diese hydrophobe Oberfläche orientiert dann, gemeinsam mit der hydrophoben Rückseite des geöffneten „Deckel-Peptids“ und der  $\beta$ 5-Schleife der HPL, das aktive Zentrum der HPL in nächster Nachbarschaft der Lipid/Wasser-Grenzfläche. Dieser Mechanismus scheint typisch für das System Pankreas-Lipase/Colipase zu sein. Bisher wurden weder in anderen Organen noch in anderen Organismen weitere Colipasen gefunden.

## 5. Anwendungen von Lipasen in der Fettchemie, in Waschmitteln, in der Papier- und der Nahrungsmittelindustrie

### 5.1. Lipasen in der Fettchemie

#### 5.1.1. Seifen und Fettsäuren

Während der größte Teil des Jahresaufkommens an Fetten und Ölen – ca. 60 Mill. Tonnen – für Ernährungszwecke verwendet wird, gelangen über 5 Mill. Tonnen als nachwachsender Rohstoff in die chemische Produktion (Fettchemie). Ein auch historisch wichtiges Beispiel ist die Seifenherstellung: Bei den heute bevorzugten Monsavom-, Sharpless- und De Laval-Centrifug-Verfahren werden Triglyceride unabhängig von der Rohstoffquelle bei erhöhter Temperatur kontinuierlich in nahezu quantitativen Ausbeuten und innerhalb weniger Minuten hydrolysiert. Der Energieverbrauch wird dabei durch ausgeklügelte Maßnahmen zur Energierückführung minimiert.<sup>[60]</sup>

Derzeit werden etwa 2 Mill. Tonnen Seife pro Jahr nach diesen Verfahren hergestellt. Bereits 1902 beschrieb dagegen Connstein ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung reiner Fettsäuren aus Talg oder Pflanzenölen mit Ricinus-Lipase.<sup>[61]</sup> Es benötigte für Ausbeuten von 60–95 % 34 Stunden bei 30 °C, je nach verwendetem Rohstoff. Obwohl ein derartiges Verfahren heute nicht wettbewerbsfähig ist, kann ein einfacher Rührkessel-Prozeß mit seinen geringen Abschreibungskosten unter geeigneten Rahmenbedingungen Wettbewerbsvorteile bieten, weil die Fettsäuren auch ohne weitere Raffination in hoher Qualität anfallen und als Koppelprodukt 20proz. Glycerinwasser gebildet wird (anstelle des höher verdünnten Glycerins bei den chemisch-technischen Prozeßen). Miyoshi Yushi in Nagoya, Japan, scheint derzeit das einzige Unternehmen zu sein, das nennenswerte Mengen an Seifen durch die Lipase-katalysierte Hydrolyse von Fetten und Ölen herstellt. Dabei wird in einem

Satzreaktor bei 40 °C, in einer Reaktionszeit unter 48 Stunden, Lipase aus *Candida rugosa* verwendet.

Ein Schlüsselprodukt der Fettchemie sind die Fettalkohole, die durch katalytische Reduktion von Fettsäremethylestern bei 200–300 bar und 200–300 °C in Festbettreaktoren hergestellt werden.<sup>[60, 62]</sup> Fettsäremethylester gewinnt man durch Umesterung der Triglyceride mit Methanol. Beide Verfahrensschritte sind soweit optimiert, daß die Ausbeuten bei minimalem Energieverbrauch nahezu quantitativ sind. Die thermische Belastung des Produkts bedingt allerdings nachfolgende Raffinationsschritte, und hitzeempfindliche Öle wie Fischöl müssen getrennt verarbeitet werden. Einige Unternehmen haben deshalb immer wieder Verfahren zur Lipase-katalysierten Umesterung oder Spaltung von Fetten und Ölen untersucht. Dabei traten zahlreiche Probleme zutage, vor allem, daß a) die Reaktionszeit, anders als bei den chemischen Verfahren, stark vom eingesetzten Triglycerid abhängt (Hydrolysegeschwindigkeit bei einer für das Enzym verträglichen Temperatur von ca. 40 °C für Olivenöl > Sojaöl = Sonnenblumenöl > Palmöl > Kokosöl > Talg), b) die Raum-Zeit-Ausbeuten deutlich geringer als beim chemischen Prozeß sind und deshalb teure Mehrstufen-Reaktionstechnik nach sich ziehen, c) für die Abtrennung des Glycerinwassers wegen Emulsionsbildung an der Grenzfläche eine teure Trenntechnik erforderlich ist und d) die kontinuierliche Prozeßführung mit Lipasen unter diesen Bedingungen an der zu geringen Stabilität des Enzyms scheitert. Derzeit ist Nippon Oils & Fats, ein mittelständisches Unternehmen in Tokio, wahrscheinlich das einzige Unternehmen, das einen Lipase-katalysierten Prozeß zur Herstellung hochreiner ungesättigter Fettsäuren (Öl-, Linol-, Linolensäure usw.) einsetzt.<sup>[63]</sup> Die Fettsäuren werden allerdings nur im kg-Maßstab hergestellt und konkurrieren im Markt zunehmend mit reinen Fettsäurepräparaten, die durch den Einsatz von Ölen aus genetisch modifizierten Pflanzen zugänglich werden.

### 5.1.2. Umgeesterte Triglyceride

Im Vergleich zur Lipase-katalysierten Hydrolyse von Triglyceriden bietet ihre enzymatische Umesterung potentielle Vorteile, da viele Lipasen *sn*-1,3-spezifisch sind: Anders als bei chemischen Verfahren können also die *sn*-1 und *sn*-3-Positionen eines Triglycerids regioselektiv umgeestert werden, wenn es gelingt, die leicht stattfindende Acylwanderung von *sn*-2 nach *sn*-1 oder *sn*-3 zu unterbinden. Drei Typen enzymatisch modifizierter Triglyceride verdienen in diesem Zusammenhang Beachtung: a) Fette mit verbesserter Streichfähigkeit, b) Kakaobutter-Äquivalent und c) „funktionelle Triglyceride“ mit hohem Verdauungswert.

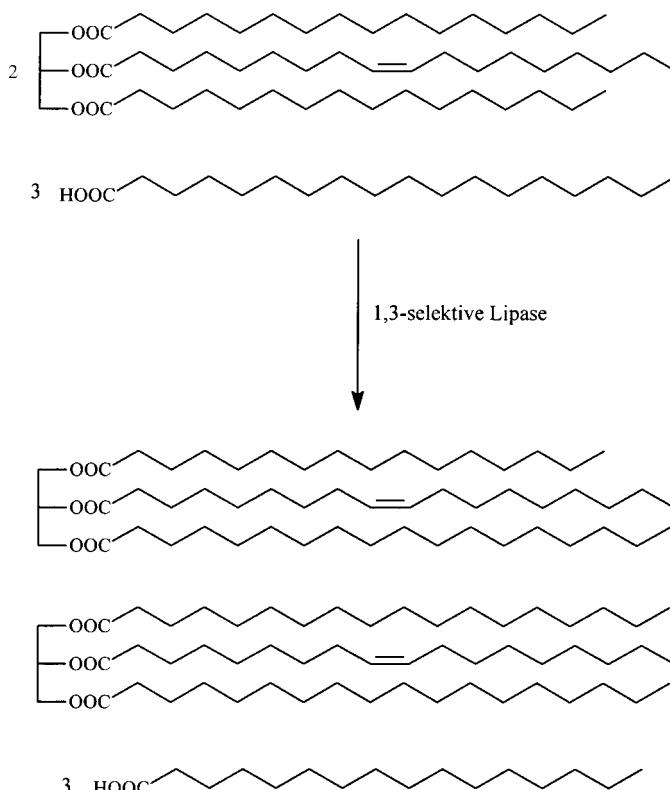
#### 5.1.2.1. Fette mit verbesserter Streichfähigkeit

Der Schmelzpunkt eines Fettes wird in der Technik derzeit vor allem durch den Grad der katalytischen Hydrierung der Doppelbindung ungesättigter Fettsäuren moduliert. Die Herstellung von Margarinen und Dressings aus Pflanzenölen ist ein Beispiel dafür. Alternativ kann das gewünschte Schmelzverhalten aber auch durch Umesterung niedrig- und hochschmelzender Triglyceridgemische mit *sn*-1,3-spezifischen

Lipasen oder einer Kombination aus Umesterung und katalytischer Hydrierung eingestellt werden.<sup>[64, 65]</sup>

#### 5.1.2.2. Kakaobutter-Äquivalente

1995 betrug der Import an Kakaobutter aus tropischen Ländern wie Kenia und Malaysia einige 100000 Tonnen. Wegen ihres Schmelzpunkts im Bereich der menschlichen Körpertemperatur ist dieses Fett für Suppositorienmassen gut geeignet. Die Hauptanwendung liegt aber in der Herstellung von Schokoladen, wo das schnelle Schmelzen zu einem angenehmen „Mundgefühl“ führt. Die Haupttriglyceride von Kakaobutter weisen in Position *sn*-2 des Glycerides Ölsäure, in den Positionen *sn*-1 und *sn*-3 Stearin- bzw. Palmitinsäure auf (Kurzschreibweise: SOS und SOP). Kakaobutter-Äquivalente können chemisch oder mit Lipase-Katalyse durch Umesterung geeigneter Triglyceride (z.B. der Mittelfraktion von Palmöl (POP) oder hochölsäurehaltigen Sonnenblumenöls (OOO) mit Stearin- oder Tristearin (SSS)) erhalten werden (Schema 3).<sup>[66, 67]</sup>



Schema 3. Umesterung eines natürlichen Triglycerids mit einer *sn*-1,3-regioselektiven Lipase.

Da die primären Hydroxygruppen von Glycerin reaktiver sind als die sekundäre Hydroxygruppe in *sn*-2, werden dabei vorwiegend Triglyceride vom Typ SOP oder SOS gebildet. Unter lebensmittelrechtlichen Gesichtspunkten ist die Lipase-Katalyse dabei ein „natürliches Verfahren“ und führt damit nicht zu einer Deklarationspflicht für das Produkt. Die Lipase-katalysierte Herstellung von Kakaobutter-Substituenten ist deshalb von vielen Unternehmen untersucht worden. Unichema, eine Gründung von Unilever und nun Tochterun-

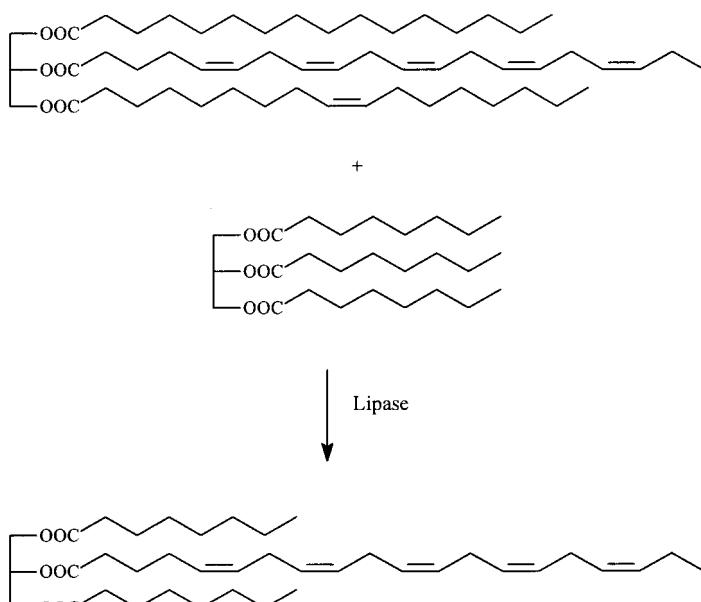
ternehmen der ICI, stellt einige hundert Tonnen von „chocolate fat“ (SOS) durch Umesterung von stark ölsäurehaltigem Sonnenblumenöl mit Stearinsäure in einem lösungsmittelfreien Satzreaktor her, wobei immobilisierte Lipase aus *Rhizomucor miehei* zum Einsatz kommt.<sup>[68]</sup> In Japan betreibt Fuji Oil Co. eine Anlage mit einer Produktionskapazität von einigen 1000 Tonnen pro Jahr für einen ähnlichen Prozeß, bei dem Lipase aus *Rhizopus* verwendet wird.<sup>[69]</sup>

### **5.1.2.3. „Funktionelle“ Triglyceride mit hohem Verdauungswert**

Die Verdaulichkeit von Triglyceriden hängt stark von ihrer Zusammensetzung ab. So können Palmitinsäure-haltige Triglyceride nur dann gut verdaut werden, wenn sich diese Fettsäure in Position *sn*-2 befindet. Ein kommerzielles Produkt diesen Typs ist Betapol (OPO) von Unichema, ein Diätfett für frühgeborene Kinder. Es wird durch Umesterung von Tripalmitin mit Ölsäure unter Verwendung von immobilisierter Lipase aus *Rhizomucor miehei* gewonnen. Triglyceride vom Typ MLM mit langkettigen gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren (L) in Position *sn*-2 und mittelkettigen Fettsäuren (M) in Positionen *sn*-1 und *sn*-3, ermöglichen eine schnelle Zuführung von Energie, da sie bevorzugt von Pankreas-Lipase hydrolysiert und die entstandenen Monoglyceride mit hoher Ausbeute aus dem Darm resorbiert werden. Einige Produkte dieses Typs sind bereits kommerziell erhältlich, z. B. Caprenin ( $C_6-C_{22,0}-C_8$ ) von Procter & Gamble. Sie werden allerdings durch chemische Umesterung gewonnen. MLM-Triglyceride mit essentiellen Fettsäuren vom Typ  $C_{20,5}$  oder  $C_{22,6}$  in Position *sn*-2 haben eine günstige pharmakologische Wirkung bei kardiovaskulären und Entzündungserscheinungen gezeigt. Sie können bevorzugt mit *sn*-1,3-spezifischen Lipasen aus Fischölen und kurzkettigen Fettsäuren hergestellt werden (Schema 4), da eine chemische Umesterung in diesem Fall leicht zu Nebenreaktionen wie radikalischen Oxidationen, *cis-trans*-Isomerisierungen oder Wanderungen der Doppelbindungen führt.<sup>[70, 71]</sup>

### **5.1.3. Monoglyceride**

1993 wurden ca. 120 000 Tonnen Monoglyceride und Mono-/Diglycerid-Gemische hergestellt; das bevorzugte Verfahren ist die Glycerolyse von Triglyceriden. Das Reaktions-



Schema 4. Herstellung eines funktionellen Triglycerids mit einer *sn*-1,3-spezifischen Lipase.

gemisch wird durch Kurzwegdestillation aufgetrennt, wodurch Monoglyceride in >90% Reinheit erhalten werden. Monoglyceride sind milde Emulgatoren (HLB-Wert 3.4, HLB = hydrophilic lipophilic balance) und für den Zusatz in Lebensmitteln zugelassen. Anwendungen finden sie deshalb vor allem in der Lebensmitteltechnologie, in der Kosmetik und in der Galenik.<sup>[62, 72, 73]</sup> Zur Herstellung von Monoglyceriden durch Lipase-Katalyse gibt es umfangreiche Literatur; das Kernproblem der Verfahren ist immer die Bildung von Produktgemischen.<sup>[74, 75]</sup> Tabelle 6 gibt einen Überblick über enzymatische Herstellungsverfahren für Monoglyceride.

Unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten bietet keiner dieser Prozesse Vorteile gegenüber der chemischen Herstellung durch Glycerolyse. Selbst mit einer Lipase aus *Penicillium roquefortii*, die eine einstufige Herstellung von Monoglyceriden in >90 % Reinheit durch Glycerolyse von Triglyceriden ermöglicht, konnte kein Durchbruch erzielt werden. Die Verwendung von Lipasen könnte allerdings bei der Herstellung von Glycerinen mit labilen Substituenten wie 8'-Apo- $\beta$ -Carotinsäure vorteilhaft sein, die chemische Verfahrensschritte nicht tolerieren.<sup>[76]</sup>

Tabelle 6. Lipase-katalysierte Synthese von Monoglyceriden.

Verfahren	Einzelheiten	Ergebnisse und Bemerkungen
Hydrolyse oder Alkoholyse	benötigt 1,3-spezifische Lipasen	Acylwanderung von <i>sn</i> -2 nach <i>sn</i> -1/-3 kann zur kompletten Hydrolyse des Triglycerids führen
Veresterung	a) mit Glycerin und Fettsäure unter Verwendung beliebiger Lipasen b) mit Isopropyliden-geschütztem Glycerin	a) da Monoglyceride bessere Nucleophile als Glycerin sind, bilden sich Mischungen aus Mono- und Diglyceriden b) führt zu reinen Monoglyceriden, aber erfordert Schutzgruppenchemie
hochselektive Lipase	Lipase aus <i>Penicillium roquefortii</i> ermöglicht die Bildung von 90proz. Monoglyceriden aus Triglyceriden	
Glycerolyse und verbesserte Prozeßtechnik	der Einsatz eines Enzymmembranreaktors mit Gegenstromextraktion ermöglicht die kontinuierliche Abtrennung der Monoglyceride, die alternativ auch ausgefällt oder kältegefällt werden können	beste Ergebnisse, aber aufwendige Prozeßführung

## 5.2. Lipasen in Waschmitteln

Der Zusatz von Lipasen zu Waschmitteln wurde im Zusammenhang mit der Entfernung von Fettanschmutzungen<sup>[77–80]</sup> und der In-situ-Bildung von Persäuren zur Bleichung farbiger Pigmentverschmutzungen<sup>[81]</sup> beschrieben.

### 5.2.1. Entfernung von Fettanschmutzungen

Nach dem großen wirtschaftlichen Erfolg der Waschmittelproteasen unternahm die Enzymindustrie große Anstrengungen, Lipasen als weiteres Waschmittelenzym einzuführen. Man hoffte, daß Lipasen im Hinblick auf niedrigere Waschtemperaturen und gestiegene ökologische Anforderungen mit chemisch hergestellten Tensiden konkurrieren könnten. Waschflotten enthalten meist anionische und nichtionische Tenside, Oxidantien und Komplexbildner und arbeiten bei einem pH-Wert um 10 und Temperaturen um 50 °C – nicht-physiologische Bedingungen, bei denen die meisten Enzyme schnell ihre Aktivität verlieren. Screening-Projekte zur Suche stabiler Lipasen führten zwar bald zu Erfolgen, zeigten aber auch, daß der marginale Reinigungseffekt dieser Enzymgruppe durch die Optimierung der Tensidzusammensetzung kompensiert werden konnte.<sup>[82]</sup> Glücklicherweise können spezielle Lipasen auch die Ablagerung von bereits gelöstem Fett auf gewaschenen Textilien verhindern und pigmentbeladene Fettverschmutzungen wie Lippenstift gut von der Wäschefaser entfernen. Novo-Nordisk war das erste Unternehmen, das angesichts dieser Ergebnisse eine Waschmittel-Lipase in den Markt einföhrte. Das Produkt Lipolase, eine Pilz-Lipase aus *Humicola lanuginosa*, wird seit Ende der achziger Jahre durch einen rekombinanten *Aspergillus oryzae*-Wirtsstamm im großen Maßstab auf Hokkaido in Japan hergestellt und nach Nordamerika und Europa exportiert.<sup>[23]</sup> Wahrscheinlich war dieses Enzym das erste gentechnisch veränderte Protein, dessen Verwendung in Haushaltsprodukten und Freisetzung in die Umwelt durch die nationalen Behörden der EU-Mitgliedsstaaten genehmigt wurde. Heute befinden sich in nahezu allen Waschmitteln gentechnisch hergestellte und optimierte Proteasen und Lipasen. Die wichtigsten Handels- und Entwicklungsprodukte sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die hier aufgeführten Lipasen weisen ein ausgezeichnetes sekundäres Waschverhalten auf. Ergänzend ist das Enzym Cutinase zu erwähnen, das eine sehr gute Wirkung bei der Entfernung von Wachsestern in Lippenstift-Formulierungen aufweist.

Tabelle 7. Kommerzielle Waschmittel-Lipasen und Versuchsprodukte.

Produktbezeichnung	Firma	Herkunft der Lipase	pH-Optimum	T-Optimum
Lipolase	Novo-Nordisk	<i>Humicola lanuginosa</i> , in <i>Aspergillus oryzae</i> kloniert und exprimiert	10.0	40 °C
Lipomax	Gist-Brocades <sup>[a]</sup>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> , im gleichen Organismus kloniert und exprimiert	11.0	45 °C
Lumafast	Genencor <sup>[a]</sup>	<i>Pseudomonas mendocina</i> , in <i>Bacillus spec.</i> kloniert und exprimiert	10.5	40 °C

[a] Die Aktivitäten der Enzymsparten von Gist-Brocades und von Genencor sind seit 1995 in der Unternehmensgruppe Genencor International B.V., Delft (Niederlande), zusammengefaßt.

### 5.2.2. In-situ-Herstellung von Persäuren als Bleichmittel

Unter den schwach alkalischen Bedingungen beim Waschvorgang sind Persäuren der Kettenlänge C<sub>8</sub>–C<sub>12</sub> bereits bei niedrigen Temperaturen ausgezeichnete Oxidationsmittel und haben deshalb ein großes Potential als Bleiche für die Kaltwäsche. Wegen ihrer geringen Stabilität können sie aber Waschmittelformulierungen nicht zugesetzt werden. Die Lipase-katalysierte Herstellung von Persäuren in situ wurde deshalb intensiv bearbeitet. Allerdings zeigen die derzeit verfügbaren Lipasen nur eine geringe Neigung, in einer wäßrigen Lösung in Gegenwart von Wasserstoffperoxid Persäuren zu bilden, wahrscheinlich weil im alkalischen Milieu die Hydrolyse des primär gebildeten Acylenzyms schneller erfolgt als dessen Perhydrolyse.<sup>[81]</sup>

## 5.3. Lipasen bei der Papierherstellung

Nihon Seishi Co., ein Papierhersteller in Tokio, hat einen Prozeß zur Verbesserung der Papierherstellung entwickelt, bei dem Triglyceride im Zellstoff durch Zusatz von Lipase abgebaut werden. Das Verfahren wird im Maßstab von mehreren hundert Tonnen Zellstoff pro Tag angewendet, und zwei weitere japanische Papierhersteller nutzen bereits ein ähnliches Verfahren.<sup>[83]</sup>

## 5.4. Lipasen in der Milchindustrie

Rennetpaste, aus den Mägen von Wiederkäuern wie Kühen und Ziegen isoliert, wird traditionell zur Herstellung von Käse verwendet.<sup>[84]</sup> Die aktive Komponente von Rennet ist Chymosin, eine Aspartat-Protease, die durch Spaltung von  $\kappa$ -Casein die Ausfällung des Milchcaseins katalysiert. Rennet enthält aber auch Esterasen und Lipasen, die an der Käsereifung beteiligt sind. 1955 verbot die US-amerikanische Food and Drug Administration den Import von Kälber-Rennet in die USA wegen dessen schlechter Qualität. Seither ist die Gewinnung von Proteasen und Lipasen aus anderen Quellen für die Käsereifung intensiv bearbeitet worden. Abhängig von der Kettenlängen-Spezifizität der Lipase kann deren Zusatz zur Milch das Käsearoma intensivieren, die Reifung beschleunigen oder auch die Herstellung von „Enzym-modifiziertem Käsearoma“ (EMC) ermöglichen, einem wichtigen industriell hergestellten Aroma, das in den USA für die Herstellung von Tunken, Soßen, Salatdressings, Cracker usw. eingesetzt wird. EMC wird durch Zusatz von Lipase zum

Rohkäse bei erhöhter Temperatur hergestellt; dadurch erhöht sich der Anteil geschmacksbildender freier Fettsäuren etwa um das Zehnfache. Tabelle 8 enthält einige Beispiele für Lipasen, die derzeit für die Käseherstellung und zur beschleunigten Käsereifung eingesetzt werden.

Tabelle 8. Beispiele für die Verwendung von Lipasen bei der Käseherstellung und -reifung.

Käsetyp	Lipase
Romano, Domiati, Feta	prägastrische Lipase von Schaf oder Ziege, <i>Mucor miehei</i>
Mozarella, Parmesan, Provolone	prägastrische Lipase von Schaf oder Ziege
Fontina, Ras, Romi	<i>Mucor miehei</i>
Cheddar, Manchego, Blue	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i>

Abhängig von der Kettenlängen-Spezifität dieser Enzyme werden entweder bevorzugt kurzkettige Fettsäuren ( $C_4$ – $C_6$ ) freigesetzt, was zu einem scharfen, pikant-säuerlichen Aroma führt, oder aber mittel- und langkettige Fettsäuren ( $>C_{12}$ ), die ein mehr seifiges Aroma vermitteln, aber auch schnell von den mikrobiellen Mischkulturen im Käse zu anderen Geschmacksstoffen wie Acetessigsäure,  $\beta$ -Oxosäuren, Methylketonen sowie „Geschmacksestern und -lactonen“ metabolisiert werden. Der Zusatz von Lipasen zu pasteurisierter Kuhmilch kann zu Geschmacksnoten führen, die an Ziegen-, Schafskäse oder Rohmilch erinnern, wenn gleichzeitig geeignete Starterkulturen zugesetzt werden.

## 6. Lipasen als Biokatalysatoren in der organischen Synthese

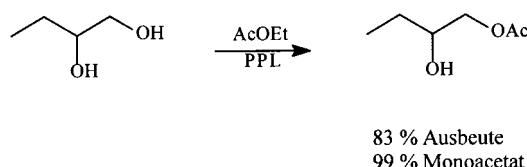
Im Hinblick auf ihre spezifische und insgesamt begrenzte Funktion im Stoffwechsel sollte man erwarten, daß Lipasen für die Organische Chemie von geringem Interesse sind. Das Gegenteil ist aber wahr: Für den Chemiker sind Lipasen zu sehr vielseitigen Biokatalysatoren geworden.<sup>[15, 85–90]</sup> Dafür sind vor allem folgende Gründe verantwortlich:

1. Lipasen verfügen über große hydrophobe Substratbindungsdomänen mit gering ausgeprägter spezifischer Charakteristik, die für die Bindung und Aktivierung von längerkettigen Acylgruppen erforderlich sind, und können eine große Zahl unterschiedlicher hydrophober Substrate binden. Dabei zeigen sie häufig eine hohe Regio- oder Stereoselektivität.
2. Lipasen wirken an der Grenzfläche von Wasser und Öl. Sie weisen eine sehr stabile Architektur auf, und können so dem denaturierenden Effekt dieser Grenzfläche standhalten, was ihren Einsatz in vielen organischen Lösungsmitteln ermöglicht.
3. Die Freie Energie der Fetthydrolyse liegt bei  $0 \text{ kJ mol}^{-1}$ .<sup>[91, 92]</sup> Das thermodynamische Gleichgewicht einer Lipase-katalysierten Reaktion kann deshalb leicht durch die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches be-

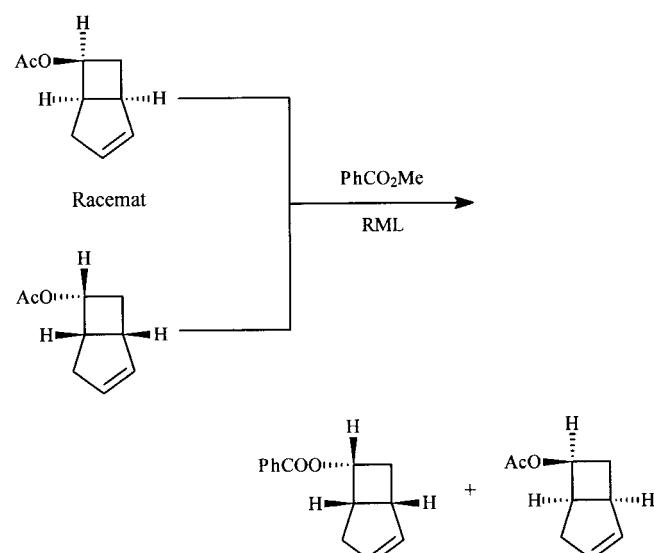
einflußt werden, so daß Hydrolysen mit Lipasen in wasserarmem Milieu leicht in Estersynthesen umkehrbar sind.

4. Der intermediär gebildete Acyl-Lipase-Komplex ist, chemisch gesehen, ein Acylierungsmittel. In Verbindung mit der breiten Substratspezifität der Lipasen sind deshalb Acylierungen mit zahlreichen Nucleophilen möglich.

Infolge dieser einzigartigen Kombination von Eigenschaften haben Chemiker eine große Zahl von Reaktionen mit Lipasen beschrieben.<sup>[93–103]</sup> In einer umfangreichen Monographie über Biotransformationen in der organischen Synthese sind fast ein Drittel aller Beispiele Umsetzungen mit Lipasen.<sup>[85, 89]</sup> Wenn polyfunktionelle Substrate, Isomere, racemische oder prostereogene Edukte verwendet werden, reagieren Lipasen zudem regio- und/oder stereoselektiv. So katalysiert PPL<sup>[104]</sup> (Erläuterung der Abkürzungen in Tabelle 3) – eigentlich zur Hydrolyse von wasserunlöslichen Triglycerid-Gallensäuren-Gemischen im Zwölffingerdarm evolviert – die in Schema 5 gezeigte regioselektive Reaktion, und RML ist ein ausgezeichneter Katalysator zur enantioselektiven Umesterung in hohen Ausbeuten (Schema 6).<sup>[105]</sup>



Schema 5. Regioselektive Veresterung durch PPL.



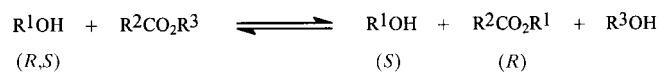
Schema 6. Beispiel für eine regioselektive Umesterung durch RML;  $E = 206$  (Acylierung),  $E = 8$  (Hydrolyse).

Die einzige größere Limitierung hinsichtlich der Selektivität von Lipasen ist ihre begrenzte Eignung für die Umsetzung raumerfüllender Acylgruppen: Im allgemeinen werden gemäß dem Vorbild der Triglyceride lineare aliphatische Acylgruppen besser umgesetzt als Arene.

## 6.1. Selektivität von Lipasen gegenüber nichtnatürlichen Estern

### 6.1.1. Kinetische Racematspaltung

Wie in Schema 5 und 6 gezeigt, können Lipasen häufig enantiomere oder enantiotope Gruppen prosterioregener Moleküle mit hoher Enantioselektivität umsetzen. Im Fall racemischer Edukte kann diese Eigenschaft zur kinetisch kontrollierten Anreicherung eines Enantiomers benutzt werden, was eine maximale Ausbeute von 50 % zur Folge hat. Da Lipase-katalysierte Reaktionen allerdings immer reversibel sind, ist daran zu denken, daß die Rückreaktion zu erneuter Racemisierung führen kann. Liefert also die Vorwärtsreaktion bei der Acylierung eines racemischen Alkohols mit Lipase vorwiegend den (*S*)-Alkohol und den (*R*)-Ester, kann die Rückreaktion des achiralen Produkts (*R*<sup>3</sup>OH) mit dem (*R*)-Ester zur Bildung des (*R*)-Alkohols führen (Schema 7). Sobald diese Rückreaktion ein nennenswertes Ausmaß erreicht, was von der Gleichgewichtslage der Reaktion abhängt, nehmen die Enantiomerenreinheit des Edukts und die des Produkts ab.<sup>[106, 107]</sup>



Schema 7. Racematspaltung eines Alkohols durch Lipase.

Dieser Reaktionstyp lässt sich kinetisch nach Gleichung (1) beschreiben. Im Fall einer irreversiblen Reaktion ohne Substratinhibition bis zu 40 % Umsatz errechnet sich der Umsatz gemäß Gleichung (2). Der „*E*-Wert“ (als Maß für die Enantioselektivität) ist dabei sowohl von der Substratkonzentration als auch vom Umsatz unabhängig.<sup>[106, 107]</sup> Er kann nach Gleichung (3) berechnet werden und ist ein Maß für die Selektivität eines Enzyms gegenüber zwei Enantiomeren. Die erzielbaren Enantiomerenüberschüsse sind in Abbildung 4 dargestellt.

$$K = \frac{1 - c_e}{c_e} \quad (1)$$

(*c<sub>e</sub>* = Umsatz im Gleichgewicht)

$$U = \frac{\text{ee(S)}}{\text{ee(S)} + \text{ee(P)}} \quad (2)$$

(*ee* = Enantiomerenüberschuß für das Substrat S bzw. das Produkt P)

$$E = \frac{\ln[(1 - U)(1 - \text{ee(S)})]}{\ln[(1 - U)(1 + \text{ee(S)})]} = \frac{\ln[(1 - U)(1 - \text{ee(P)})]}{\ln[(1 - U)(1 + \text{ee(P)})]} \quad (3)$$

Bei der Verwendung von Lipasen für Veresterungen muß darauf geachtet werden, das Reaktionswasser zu entfernen. Dies kann z.B. durch Anlegen eines Vakuums oder durch Zugabe von Molekularsieb geschehen. Alternativ kann der Acyldonor im großen Überschuß verwendet werden, beispielsweise beim Einsatz von Essigsäureethylester als Acyldonor und Lösungsmittel. Auch Ester mit guten Abgangsgruppen wie Trifluor- und Trichloressigsäureester oder Anhydride wurden erfolgreich eingesetzt. Irreversibel einsetz-

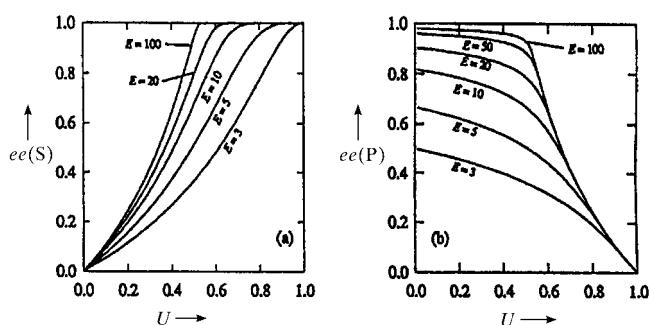
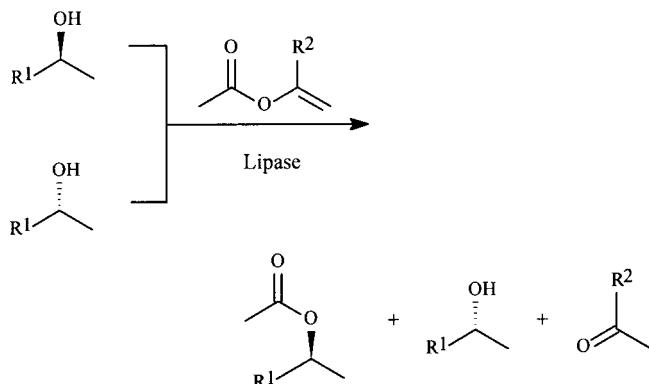


Abb. 4. Enantiomerenüberschuß *ee* als Funktion von Umsatz *U* und „*E*-Wert“ für Substrat (a) und Produkt (b) bei irreversibler Reaktion.<sup>[14]</sup>

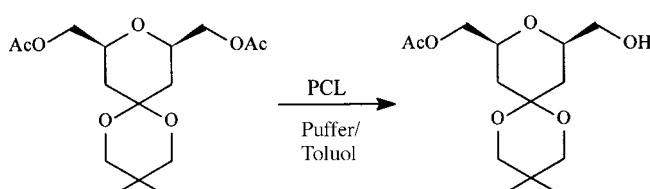
bare Reagentien wie Oximester können die Produktbildung bei der Umesterung quantitativ in die gewünschte Richtung treiben. Die Methode der Wahl ist die Verwendung von Enolestern (meist Vinyl- oder Isopropenylester), deren Alkoholfunktion nach Acylierung des Enzyms zur Aldehyd- oder Ketongruppe tautomerisiert und deshalb für die Rückreaktion nicht mehr zur Verfügung steht (Schema 8). Diese Methode wurde nahezu gleichzeitig von de Jeso et al.<sup>[108]</sup> sowie von Wong et al.<sup>[109]</sup> eingeführt.



Schema 8. Irreversible Acylierung mit Enolestern (*R*<sup>1</sup>, *R*<sup>2</sup> sind allgemeine Reste).

### 6.1.2. Der „Meso-Trick“

Bei kinetischen Racematspaltungen ist die theoretische Ausbeute auf 50 % begrenzt. Ausbeuten bis zu 100 % können erreicht werden, wenn *meso*-Diester durch enantiotope Differenzierung enantioselektiv hydrolysiert oder *meso*-Diole entsprechend acyliert werden (Schema 9 und Tabelle 9).<sup>[110]</sup>



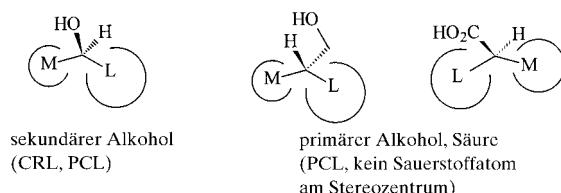
Schema 9. Anwendung des „Meso-Tricks“.

Tabelle 9. Selektive Hydrolyse von *meso*-Verbindungen durch Lipase-Katalyse.

Produkt	Lipase/Lösungsm.	Ausb. [%]	ee [%]	Lit.
	Pancreatin/Vinylacetat, THF/Et <sub>3</sub> N	65	> 99	[132]
	PSL/Isopropenylacetat	81	> 99	[133]
	PCL	80	70	[134]
	PPL/Vinylacetat, MeCN	92	> 99	[135]
	PPL/Vinylacetat	92	> 99	[136]

### 6.1.3. Halbquantitative Vorhersagen der Enantioselektivität von Lipasen

Nach sorgfältiger Analyse der Literatur über enantioselektive Umsetzungen mit den Lipasen aus *Candida rugosa* (CRL) und *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* (PCL) schlügen Kazlauskas et al. eine Regel zur Vorhersage der Enantiopräferenz dieser beiden Enzyme vor, die auf der Raumerfüllung der Substituenten am Edukt beruht. Diese für die Ester sekundärer Alkohole meist gültige Regel wird oft vereinfacht als „Kazlauskas-Regel“ bezeichnet und ist in ihrem Kern in Schema 10 dargestellt.<sup>[111]</sup> Entsprechende Versuche, das Verhalten dieser Lipasen gegenüber Estern primärer Alkohole oder Carbonsäureestern vorherzusagen, führten zu weniger zuverlässigen Ergebnissen.



Schema 10. Die „Kazlauskas-Regeln“ (M = mittelgroßer Substituent, L = großer Substituent).

Die Kazlauskas-Regel wurde kürzlich durch kristallographische Untersuchungen eindrucksvoll belegt. Cygler et al. kristallisierten dazu zwei Komplexe der CRL mit den beiden Enantiomeren eines Menthyl-Phosphonat-Inhibitors (CRL kann zwischen enantiomeren Menthylestern unterscheiden und bevorzugt das (*R*)-Enantiomer) und führten die bevorzugte Bindung des (*R*)-Inhibitors auf eine erhöhte Zahl von Wasserstoffbrücken zurück (Abb. 5).<sup>[112]</sup>

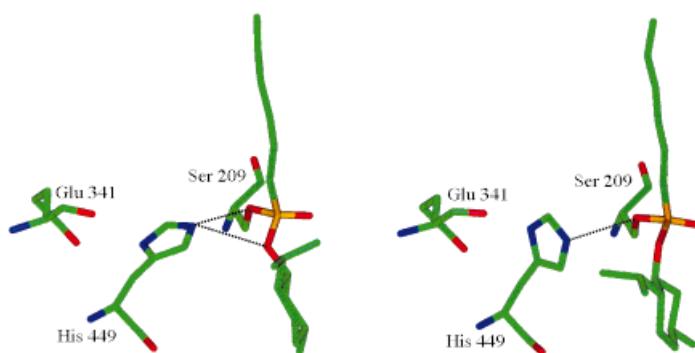


Abb. 5. Kristallstruktur der Bindung von (*R*)- (links) und (*S*)-Menthylphosphonatester (rechts) im aktiven Zentrum von *Candida-rugosa*-Lipase. Im Komplex mit dem (*R*)-Enantiomer (links) bildet His449 der katalytischen Triade zwei Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte Linien), eine zum katalytischen Ser209 und eine zur Alkoholgruppe des Menthols, während im Komplex mit dem (*S*)-Enantiomer (rechts) His449 eine Rotationsbewegung durchgeführt hat und damit seine Fähigkeit zur Wasserstoffbrückenbindung zur Alkoholgruppe des Menthols verliert.

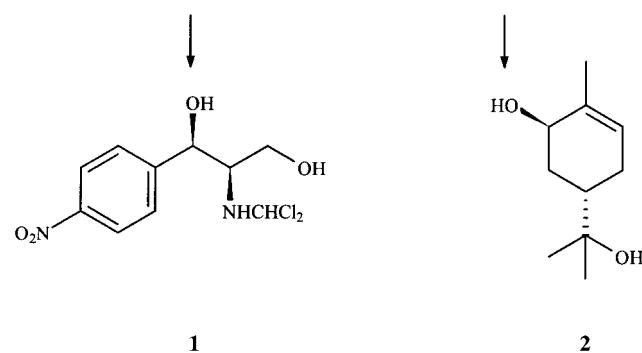
## 6.2. Lipasen als Acylierungsmittel

Der Katalysemechanismus von Lipasen (siehe Schema 2) führt primär zur Acylierung des Serinrests der katalytischen Triade. Die Folgereaktionen lassen sich formal als Acylierung von Wasser (Bildung der freien Säure) oder von einem Alkohol (Veresterung) betrachten. Im folgenden werden wir die Acylierung sauerstoffhaltiger sowie weitere Nucleophile betrachten. Wir zeigen, daß Lipasen nicht nur acyliert werden können, wenn sie Carboxylester hydrolysieren, sondern auch bei der Umsetzung von Carbonaten und anderen Edukten. Abschließend gehen wir auf industrielle Anwendungen von Lipasen in der Biokatalyse ein.

### 6.2.1. Acylierung von Hydroxyverbindungen

#### 6.2.1.1. Chemoselktive Veresterung von Hydroxyverbindungen

Hydroxyverbindungen wie Chloramphenicol **1**, Sobrerol **2** oder Oligopeptidester konnten mit PPL regioselektiv acyliert werden (Schema 11).<sup>[85, 113–115]</sup> Besonders viele Untersuchungen wurden zur Lipase-katalysierten Acylierung oder

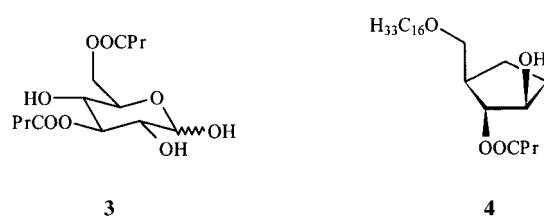


Schema 11. Position der regioselektiven Acylierung von Chloramphenicol **1** und Sobrerol **2**.

Deacylierung von Zuckern durchgeführt.<sup>[115–117]</sup> Meist handelt es sich dabei um Reaktionen zur Einführung oder Entfernung von Schutzgruppen im industriellen Umfeld, aber auch um die Herstellung von Zuckerestern, einer Klasse von Emulgatoren, die aus nachwachsenden Rohstoffen hergestellt werden können.

### 6.2.1.2. Schutzgruppenchemie mit Lipasen an Zuckern

Ungeschützte Mono- oder Disaccharide reagieren mit Lipasen wie PPL<sup>[118]</sup>, CAL<sup>[119]</sup> oder RML<sup>[120]</sup> in polaren organischen Lösungsmitteln wie DMF oder 2-Methyl-2-butanol mit lang- oder mittelkettigen Fettsäuren oder deren Estern zu 6-O-acylierten Zuckern. Die Regioselektivität liegt dabei über 70%, die Umsätze zwischen 40 und 100%. Durch Einführung von Isopropyliden- oder Phenylborat-Schutzgruppen an den sekundären Hydroxygruppen können die Regioselektivität und die Ausbeute erhöht werden. Wird die primäre Hydroxygruppe zuvor chemisch acyliert, so können auch sekundäre Hydroxygruppen Lipase-katalysiert acyliert werden, wobei die Regiopräferenz von der gewählten Lipase abhängt. So führt die Acylierung von 6-O-Butyroylglucose mit Trichlorethylbutyrat in THF durch CVL zu 3,6-Di-*O*-Butyroylglucose **3** (98% Regioselektivität),<sup>[121]</sup> während mit RJL oder CRL in Benzol die 3-Hydroxylierung von 1,4-Anhydro-5-*O*-Hexadecyl-*d*-Arabinit **4** mit Trichlorethylbutyrat in Benzol in 79% Ausbeute gelingt (Schema 12).<sup>[122]</sup>



Schema 12. Die durch Lipase-katalysierte regioselektive Bildung von Butylestern von Zuckern und Zuckerderivaten erhaltenen Ester **3** und **4**.

### 6.2.1.3. Zuckerester als Emulgatoren

Zuckerester werden mit chemischen Methoden im Maßstab von einigen tausend Tonnen pro Jahr produziert, z.B. durch die säurekatalysierte Veresterung von Sorbit mit Fettsäuren („Span“, die Ethoxylierungsprodukte sind unter dem Namen „Tween“ bekannt). Derartige Verbindungen werden industriell als Emulgatoren eingesetzt, und ihr Acylierungs- bzw. Ethoxylierungsgrad bestimmt die Grenzflächenaktivität der Produkte. Einige dieser Verbindungen wurden auch als Nahrungsmittelzusatzstoffe angemeldet, aber eine Herstellung durch Enzymkatalyse ist „natürlicher“ und deshalb von Vorteil für ihren Marktwert. Die Lipase-katalysierte Herstellung von Zuckerestern wurde deshalb von vielen Forschern intensiv untersucht; Tabelle 10 enthält nur eine kleine Auswahl der Ergebnisse. Wegen der sehr unterschiedlichen Löslichkeit der Reaktionspartner kann es vorteilhaft sein, in Schmelzen oder Festphasen anstatt in Lösungen zu arbeiten.

Monoester der Ethylglycoside werden von Unichema im 100-kg-Maßstab unter Verwendung von Lipase hergestellt. Eine große Konkurrenz für biotechnologisch hergestellte

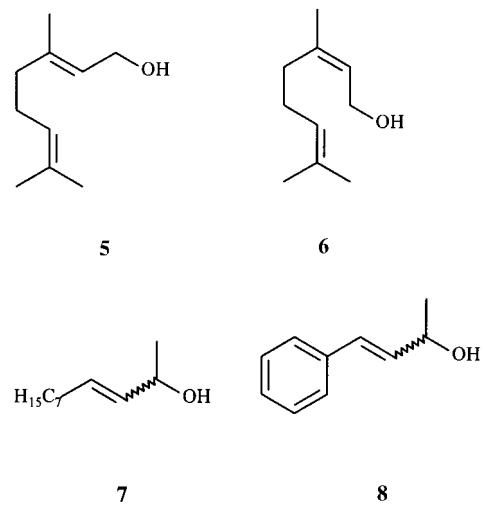
Tabelle 10. Lipase-katalysierte Synthese von Zuckerestern (Beispiele). *v* = Reaktionsgeschwindigkeit.

Zucker	Acyldonor	Lösungsmittel	Lipase	<i>v</i> [mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Lit.
Glucose	Fettsäure-trichlor-ethylester	Pyridin	PPL	0.015	[118]
Mannose	Fettsäure-oximester	Pyridin	PCL	0.028	[123]
Sorbit	Fettsäure	2-Pyrrolidon	CVL	1.4	[124]
Fructose	Fettsäure	2-Methyl-2-butanol	RML CAL-B	0.048	[120]
Glucose	Fettsäure	Aceton	CAL-B	0.2–0.4	[125]
Ethylglycosid	Fettsäure	tert-Butylalkohol	CAL-B	keine Angaben	

Zuckerester sind allerdings die aus Fettalkoholen und Zucker auch im industriellen Maßstab chemisch leicht herzustellenden Alkylglycoside.

### 6.2.1.4. Stereoisomere

(E/Z)-Stereoisomere von Allylalkoholen können durch Lipase-katalysierte (PPL, PSL) Acylierung getrennt werden, wobei immer das (*E*)-Isomer bevorzugt wird. Die Selektivität der Reaktion ist allerdings mäßig. So wurde (*E*)-Geraniol **5** im Gemisch mit (*Z*)-Nerol **6** durch PPL-katalysiert mit Trifluorethylbutyrat oder Hexansäureanhydrid in Diethylether im Verhältnis von 4:1 acyliert (Schema 13). (*E*)-Isomere sekun-

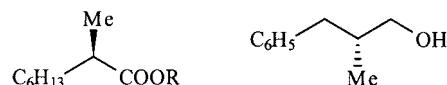


Schema 13. Die für die Lipase-katalysierte Umesterung eingesetzten Alkohole **5**–**8**.

därer Allylalkohole wie 3-Undecen-2-ol **7** oder 4-Phenyl-3-butien-2-ol **8** reagierten unter den gleichen Bedingungen allerdings 20- bis 40mal schneller als die (*Z*)-Isomere, weil das (*S*)-Enantiomer des (*E*)-Isomers wegen der hohen Enantioselektivität dieser enzymatischen Umesterung (*E*>100 für die (*E*)-Isomere, siehe Schema 13) nicht an der Reaktion teilnahm.<sup>[126]</sup>

## 6.2.1.5. Trennung racemischer Alkohole und Säuren

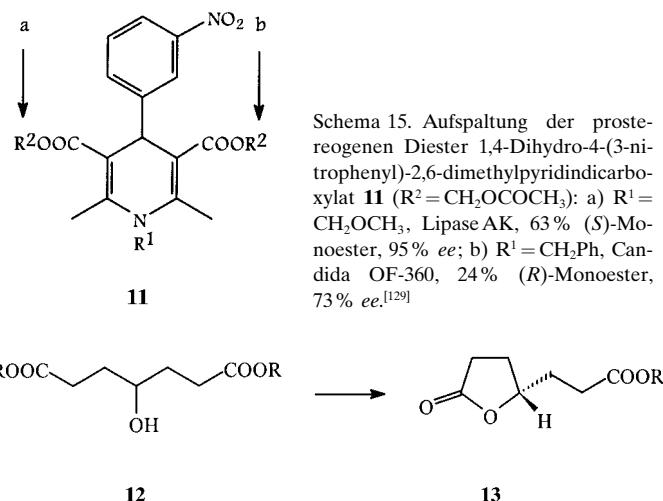
Die meisten Veröffentlichungen zur Lipase-Katalyse beschäftigen sich mit diesem Reaktionstyp. Zwei Beispiele, bei denen die Enantiomere **9** und **10** in hoher optischer Reinheit und guten Ausbeuten erhalten wurden, zeigt Schema 14, weitere werden im Abschnitt 6.3.4 über industrielle Anwendungen beschrieben.


**9**
**10**

Schema 14. Die durch Spaltung racemischer Edukte erhaltenen enantiomererenreinen Verbindungen **9** ( $\text{ROH} = 1\text{-Eicosanol}$ , 1-Dodecanol; CRL, 42 % Umsatz,  $ee = 97\%$  [127]) und **10** ( $\text{PFL}$ , 45 % Umsatz,  $ee = 97\%$  [128]).

## 6.2.1.6. Bildung enantiomererenreiner Verbindungen aus prostereogenen Alkoholen und Estern

Es wurde vielfach gezeigt, daß Lipasen Reaktionen beider Typen katalysieren, so daß hier das in Schema 15 wiedergegebene Beispiel genügen soll. Dieser Reaktionstyp wurde auch zur Bildung enantiomererenreiner Lactone (**13**) aus Diestern (**12**) verwendet (Schema 16).<sup>[130, 131]</sup>



Schema 15. Aufspaltung der prostereogenen Diester 1,4-Dihydro-4-(3-nitrophenyl)-2,6-dimethylpyridindicarboxylat **11** ( $\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ ): a)  $\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{OCH}_3$ , Lipase AK, 63 % (*S*)-Monoester, 95 % *ee*; b)  $\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$ , Candida OF-360, 24 % (*R*)-Monoester, 73 % *ee*.<sup>[129]</sup>

## 6.2.1.7. Enantiomererenreine Verbindungen durch Umsetzung von meso-Verbindungen

Da dieser Reaktionstyp zur quantitativen Umsetzung der Substrate führen kann und damit eine nachträgliche Racemisierung des „falschen“ Enantiomers umgeht, wurde er intensiv untersucht. Als Beispiel wurde bereits die Umesterung cyclischer meso-*cis*-Diole in Tabelle 9 angeführt.

## 6.3.2. Acylierung anderer Nucleophile

Lipasen können nicht nur Ester bilden, sondern auch Nucleophile wie  $\text{ROOH}$  oder  $\text{RNH}_2$  acylieren. Tabelle 11 gibt einen Überblick.

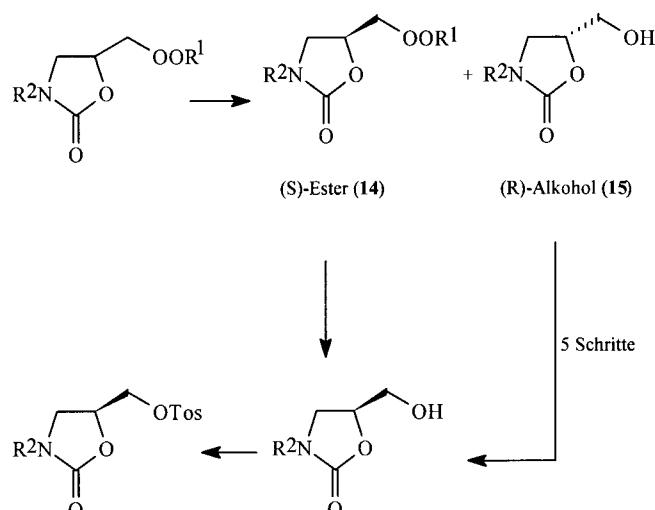
## 6.3.3. Acylierungen mit ungewöhnlichen Acylgruppen

Außer von Acylresten als acylierende Gruppe aktiverter Lipasen kann der Serinrest im aktiven Zentrum auch von ungewöhnlichen Acyldonoren wie Carbonaten acyliert werden. Ferner werden Acylierungsmittel in Strukturen mit ungewöhnlichen Heteroatomen umgesetzt. Tabelle 12 gibt einen Überblick. Damit wird deutlich, daß Lipasen eine ungewöhnlich breite Spezifität aufweisen. Aus diesem Grund, aber auch wegen ihrer Stabilität und guten Zugänglichkeit, sind sie für industrielle Anwendungen attraktiv.

## 6.3.4. Beispiele für die industrielle Nutzung von Lipasen

Enantiomererenreine Verbindungen gewinnen eine immer größere Bedeutung bei der Herstellung pharmazeutischer und agrochemischer Wirkstoffe. Lipasen wurden für den industriellen Einsatz zur Synthese enantiomererenreiner Alkohole und Säuren intensiv untersucht. Einige wichtige Zwischen- oder Endprodukte, deren Herstellung mit Lipasen im industriellen Maßstab getestet wurde, sind in Tabelle 13 aufgeführt. Allerdings muß man einräumen, daß die Zahl der erfolgreichen Beispiele noch immer verhältnismäßig gering ist. Dafür gibt es mehrere Gründe:

1. Häufig ist die Gegenwart des „falschen“ Enantiomers im racemischen Produkt kein Problem, weil keine nachteiligen Nebenwirkungen bekannt sind (Beispiele: Pyrethroide,  $\beta$ -Blocker).
2. In anderen Fällen sind physikalische Verfahren wie die Kristallisation (Naproxen, L-Menthol), die asymmetrische chemische Synthese (Diltiazem) oder die Verwendung von Vorstufen aus dem „chiralen Pool“ oder aus Fermentationsverfahren ( $\alpha$ -Phenoxypropionsäure) wirtschaftlich überlegen.
3. Ein beträchtlicher Nachteil beim Einsatz von Lipasen zur Racematspaltung ist die Bildung von 50 % des „falschen“ Enantiomers als Nebenprodukt. Obwohl dessen Racemisierung und Rückführung in die Reaktion meist technisch möglich ist, belastet sie die Kosten des Prozesses. Beispielsweise läßt sich der (*S*)-Ester **14**, ein wichtiges



Schema 17. Synthese des (*S*)-Esters **14** mit LPL und Racemisierung des (*R*)-Alkohols **15** ( $\text{R}^1 = \text{Hexyl}$ ,  $\text{R}^2 = \text{iso-Propyl}$ ).  $\text{Tos} = \text{H}_3\text{CC}_6\text{H}_4\text{SO}_2$ .

Tabelle 11. Mit Lipasen kompatible Acylacceptoren.

Acyldonor	Acylacceptor	Produkt	Bedingungen	Ausb. [%]	ee [%]	Lit.
<i>Amine als Acylacceptor</i>						
	<i>n</i> -Butylamin Phenylamin Allylamin		CRL Hexan oder CCl <sub>4</sub>	52–62	80–95	[137]
	<i>rac</i> -2-Aminobutan		CAL	45	90	[138]
	1,10-Diaminohexan 1,12-Diaminododecan		CRL Dichlormethan	35–40	–	[139]
<i>Ammoniak als Acylacceptor</i>						
	NH <sub>3</sub>		CAL, HSL 0.5–2.5 M Ammoniaklsg. <i>i</i> BuOH, 40 °C	85–95	–	[140–142]
	NH <sub>3</sub>		CAL <i>i</i> BuOH	39	91 (Amid) <i>E</i> =38	[142]
<i>Hydrazine als Acylacceptor</i>						
	substituierte Hydrazide		PCL, R = CHO a) THF oder <i>i</i> Pr <sub>2</sub> O, RT, 3 d b) 60 °C, 4 d	69–80	–	[140]
<i>Aminosäurederivate als Acylacceptoren</i>						
			PPL Toluol 45 °C, 3 d	83	–	[137]
<i>Wasserstoffperoxid und Persäuren als Acylacceptoren</i>						
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		CAL Heptancarbonsäure, 4 °C	74	–	[143]
Vinylacetat			LPL Cyclohexan	62	100	[144]

Tabelle 12. Lipasekatalyse mit ungewöhnlichen Acyldonatoren.

Acyldonorator	Acylacceptor	Produkt	Bedingungen	Ausb. [%]	ee [%]	Lit.
<i>Carbonate</i>						
	<i>n</i> -Propanol		HLL MTBE	55	90	[145]
<i>Oxazolidine</i>						
	Methanol		a: PSL b: PCL	52 61	75 90	[146]
<i>Amide</i>						
	Wasser		CRL	60	90	[147]
<i>Acyldonoren oder -acceptoren in Strukturen mit ungewöhnlichen Heteroatomen</i>						
			PSL PrOH, 25 °C	31	93	[148]
			PPL Puffer	40	83	[149]
	Me3SiCH2OH		CRL 19 h	52	96 (Säure)	[150]
Vinylacetat			PCL	80	100	[151]
Vinylacetat				47	100	[152]

Zwischenprodukt für die Synthese von  $\beta$ -Blockern, im großen Maßstab aus dem entsprechenden racemischen Alkohol durch LPL in 45% Ausbeute und mit über 99% ee bilden. Die Racemisierung des ungewünschten Nebenprodukts **15** benötigt aber fünf zusätzliche chemische Schritte (Schema 17), die eine wirtschaftliche Prozeßführung fragwürdig machen.<sup>[168]</sup>

Zwar kann der Einsatz prostereogener Verbindungen und der Rückgriff auf den „Meso-Trick“ dieses Problem umgehen, doch ist es oft nicht möglich, entsprechende Vorstufen zu synthetisieren. Trotz dieser Einschränkungen gibt es derzeit mindestens zwei industrielle Prozesse, bei denen immobilisierte Lipasen zur Synthese eines Enantiomers eingesetzt

werden: die Herstellung von Diltiazem bei Tanabe Seiyaku in Osaka, und von Aminen bei der BASF in Ludwigshafen und in den USA.

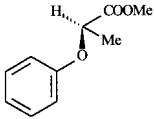
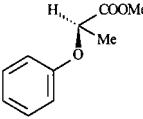
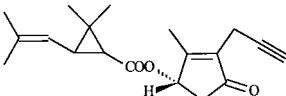
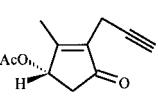
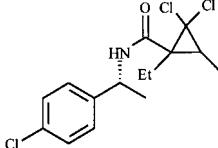
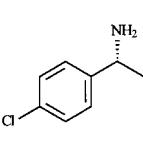
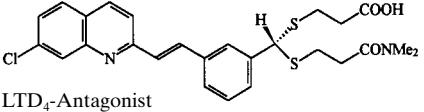
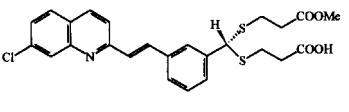
## 7. Anwendungen von Lipasen in der Medizin

Bevor wir die vielfachen technischen und synthetischen Einsatzmöglichkeiten für Lipasen und die gentechnischen Möglichkeiten zu deren weiterer Optimierung zusammenfassen, möchten wir noch kurz auf ihre physiologische Funktion und Einsatzmöglichkeiten in der Pharmakologie eingehen.

Tabelle 13. Beispiele von industrieller Bedeutung.

gewünschtes Endprodukt	chirales Zwischenprodukt oder Endprodukt	optimierte Ergebnisse	Lit.
<i>chirale Alkohole</i>			
		LPL/H <sub>2</sub> O: > 99 % ee [153]	
(S)-Betablocker	„C <sub>3</sub> -Synthesebaustein“	PPL/BuOH: 97 % ee, 49 % Umsatz PCL/Vinylacetat: > 99 % ee, 50 % Umsatz [154]	
		PPL/H <sub>2</sub> O: sehr hohe Substratkonzentration, ohne Solvens [155]	
(S,S)-Fenvalerat, ein Pyrethroidinsektizid		L/H <sub>2</sub> O: 99.8 % ee, 49 % Umsatz [156]	
		CRL: > 98 % ee, 42 % Umsatz [157]	
L-Menthol			
<i>chirale Säuren</i>			
		[158, 159]	
Enalapril, ein ACE-Inhibitor			
		Serratia marcescens: 100 % de [153, 160, 161]	
Diltiazem, ein Calcium-Antagonist			
		Esterase NP: 98 % ee, 39 % Umsatz [162]	
(S)-Naproxen, ein nicht- steroidaler Entzündungshemmer			
		PPL: 95 % ee [163]	
(R)-Carnitin, ein vitaminartiges Nahrungsmittel			

Tabelle 13. Beispiele von industrieller Bedeutung (Fortsetzung).

gewünschtes Endprodukt	chirales Zwischenprodukt oder Endprodukt	optimierte Ergebnisse	Lit.
		CCL: 95 % ee	[164]
(R)- $\alpha$ -Phenoxypropionsäure, ein Herbizid			
		99.8 % ee	[165]
Prallethrin, ein Pyrethroidinsektizid			
<i>chirale Amine</i>			
		PCL: 99 % ee, 43 % Umsatz	[166]
substituierte Phenethylamine, Herbizide			
		PCL: 98 % ee, 90 % Ausb.	[167]
LTD <sub>4</sub> -Antagonist			

## 7.1. Physiologische Eigenschaften

Nahrungsfette bestehen zu etwa 95 % aus Triglyceriden (TG).<sup>[169]</sup> Bis vor kurzem glaubte man, daß die Verdauung dieser Fette im Zwölffingerdarm (Duodenum) beginnt und ausschließlich von Pankreas-Lipase katalysiert wird. Mehrere Autoren hatten zwar eine präduodenale Lipolyse beim Menschen und am Tier festgestellt, man führte dies jedoch auf eine Enzymkontamination nach einem Reflux aus dem Zwölffingerdarm in den Magen zurück. Dieses Bild hat sich mittlerweile völlig verändert, und es wird immer wahrscheinlicher, daß gastrische und Pankreas-Lipase bei der Verdauung zusammenwirken. Viele gastrische und prägastrische Lipasen konnten mittlerweile gereinigt und charakterisiert werden, z. B. eine Zungen-Lipase der Ratte,<sup>[170]</sup> die gastrische Lipase des Menschen (HGL),<sup>[171, 172]</sup> Lipasen der Speiseröhre von Kalb und Lamm,<sup>[173]</sup> eine gastrische Lipase des Kaninchens (RGL)<sup>[174]</sup> und des Hundes (DGL).<sup>[175]</sup> Untersuchungen an freiwilligen, gesunden Probanden haben ergeben, daß gastrische und Pankreas-Lipase die Acylketten der Triglyceride in einer flüssigen Testmahlzeit zu 18 bzw. 48 % (also im Verhältnis 1:3) hydrolysierten (für eine vollständige Absorption des Fetts im Darm ist eine Hydrolyse der Triglyceride von 66 % ausreichend). Weiterhin wurde klar, daß die gastrische Lipolyse langkettiger Triglyceride von größter Bedeutung für die Aufnahmefähigkeit von Fetten durch Patienten mit

pankreatischer Insuffizienz ist und dabei die Funktion der Pankreas-Lipase teilweise kompensieren kann.<sup>[176]</sup> Ferner wurde durch In-vitro-Versuche gezeigt, daß ein Zusatz von gastrischer Lipase des Menschen oder des Kaninchens zu menschlicher Pankreas-Lipase die Fetthydrolyse beschleunigt.<sup>[177]</sup>

## 7.2. Lipasen in der Substitutionstherapie

Patienten mit exokriner Pankreasinsuffizienz, wie sie häufig mit cystischer Fibrose einhergeht, leiden vor allem unter Fehlernährung und Fettdurchfall (Steatorrhoe). Beide Probleme können zum Teil durch Gabe von Schweine-Pankreas-Lipase als Substitutionspräparat gelöst werden. In der Vergangenheit waren derartige Präparate allerdings wegen ihrer schnellen Denaturierung bei der Magenpassage unbefriedigend. Der Zusatz einer Lipase, die Nahrungsfette unter sauren Bedingungen zu hydrolysieren vermag, sollte hier weiterhelfen, einige der mit Fettabsorptionsstörungen und Fettdurchfall verbundenen klinischen Probleme zu lösen. Zur Untersuchung der Wirksamkeit säurestabiler Lipasen aus Pilzen als Substitutionspräparat bei exokriner pankreatischer Insuffizienz wurden klinische Studien an Tieren und Menschen durchgeführt; die Ergebnisse dieser Studien blieben aber trotz tendenzieller Besserungen in bezug auf Gewichts-

zunahme und Abnahme der Steatorrhoe hinter den Erwartungen zurück.<sup>[178]</sup> Die Wirksamkeit derartiger Enzyme ist wegen ihrer Empfindlichkeit gegenüber der proteolytischen Wirkung des Pepsins im Magen begrenzt. Die erfolgreiche Klonierung und Expression humaner gastrischer Lipase (HGL) könnte hier zu nachhaltigen Verbesserungen führen. Die Expression rekombinanter HGL in High-Five-Zellen betrug etwa 32 mg pro Liter Kulturmedium. Das durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelektrophorese (SDS/PAGE) bestimmte Molekulargewicht lag mit 45 kDa allerdings unter dem Wert von 50 kDa für die native HGL und deutet damit auf eine geringere Glykosylierung des Enzyms im verwendeten Baculovirus-Expressionssystem hin. Die maximal erzielbare spezifische Aktivität des rekombinanten Enzyms betrug  $434 \text{ Umg}^{-1}$  gegenüber langketten Triglyceriden (Intralipid) und war gegenüber mittel- und langketten Triglyceriden etwas höher.<sup>[179]</sup> Da die gastrische Lipase des Hundes (DGL) im Unterschied zum Human-Enzym bevorzugt langketige Triglyceride spaltet, wäre sie in Verbindung mit Pankreas-Lipase als Substitutionsprodukt noch besser geeignet.<sup>[180]</sup> DGL könnte wahrscheinlich auch die Fettabsorption bei Patienten mit cystischer Fibrose verbessern, wenn sie in Verbindung mit Pankreas-Lipase appliziert würde.<sup>[181]</sup>

### 7.3. Lipase-Inhibitoren als Schlankheitsmittel

Die konventionelle Therapie zur Behandlung von Übergewicht besteht in der Kontrolle der Energieaufnahme. Alternativ könnten auch Lipase-Inhibitoren eingesetzt werden. Klinische Untersuchungen zum Einsatz von Tetrahydrolipstatin **16** (THL, Schema 18), einem Stoffwechselprodukt

Voraussetzung für seine Wirksamkeit in vivo, da Pankreas-Lipase in einer Fettsäure gemeinsam mit Gallensäuren und Triglyceriden vorliegt und wasserlösliche Inhibitoren deshalb nicht zum aktiven Zentrum gelangen könnten.<sup>[185]</sup> Versuche an gesunden Versuchspersonen haben ergeben, daß die Infusion von THL in den Zwölffingerdarm die Pankreas-Lipase stark inhibiert, was angesichts der Versuchsbedingungen sowohl auf eine verringerte Sekretion als auch auf Enzymhemmung zurückgeführt werden kann.<sup>[186]</sup>

## 8. Die Zukunft: hochreine und gentechnisch optimierte Lipasen

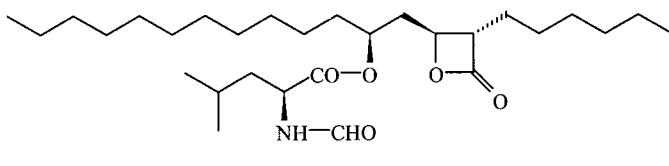
### 8.1. Hochreine Lipasen

Lipasen finden zahlreiche Anwendungen z.B. in Waschmitteln, in der Fettchemie, bei der Käseproduktion, in der medizinischen Therapie und in der organischen Synthese. Bis jetzt wurden bereits über 30 Lipasen unterschiedlicher Herkunft kloniert und in geeigneten Wirtsstämmen exprimiert. Reine rekombinante Lipasen aus *Humicola lanuginosa*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mucor miehei*, *Candida antarctica* (Typ B), *Bacillus thermocatenulatus* und anderen Quellen sind in löslicher oder immobilisierter Form kommerziell erhältlich, oft auch in kombinierter Form für das Screening (z.B. Chirozym von Boehringer-Mannheim). Quervernetzte Kristalle von CRL und PCL (ChiroCLEC) werden von Altus (Cambridge, MA) angeboten. Die Tertiärstrukturen von zwölf Lipasen wurden aufgeklärt, und wegen des großen Anwendungspotentials dieser Enzymgruppe darf man annehmen, daß diese Zahl in den nächsten Jahren zunehmen wird.

### 8.2. Protein-Engineering von Lipasen

Die Substratbindungsdomänen verschiedener Lipasen unterscheiden sich deutlich, so daß sich die Unterschiede in ihrer katalytischen Wirkung rational erklären lassen. In Abbildung 6 sind die Substratbindungsstellen für vier Lipasen in ihrer aktivierten Form (mit offenem Deckel) dargestellt. Obwohl diese Abbildungen auf der Homologie-Modellierung von Lipase-Inhibitor-Komplexen und Moleküldynamikrechnungen und nicht auf Röntgenstrukturanalysen beruhen, legen sie nahe, daß unterschiedliche Lipase-Typen im Bereich des aktiven Zentrums unterschiedliche sterische und elektronische Umgebungen aufweisen. So variiert der Abstand des aktiven Serins von der Oberfläche zwischen 5 (ROL) und 16 Å (PCL). In Tabelle 14 sind Veröffentlichungen über gentechnisch modifizierte Lipasen zusammengestellt, wobei die meisten Informationen aus der Patentliteratur stammen.

Da Waschmittel derzeit das bedeutendste wirtschaftliche Einsatzgebiet für Lipasen sind, beschäftigen sich die meisten Patente mit der Verbesserung des Enzyms für diesen Einsatzbereich.<sup>[78]</sup> Im Vergleich dazu sind Beispiele zum Lipase-Design für fettchemische Prozeße oder für die organische



**16**

Schema 18. Tetrahydrolipstatin (THL) **16**, ein starker Inhibitor von Pankreas- und gastrischer Lipase sowie von Cholesterinester-Hydrolase.

von *Streptomyces toxytricini*, sind bei Hoffmann LaRoche bereits in Phase III der klinischen Erprobung. THL inhibiert nicht nur gastrische und Pankreas-Lipasen in vitro und in vivo, sondern auch Cholesterinester-Hydrolase.<sup>[182, 183]</sup> Man nimmt an, daß sich dabei ein stöchiometrischer Enzym-Inhibitor-Komplex in Form eines Acylenzyms bildet, der unter Rückbildung der funktionsfähigen Enzyme und inaktivierten THLs langsam hydrolysiert.<sup>[184]</sup> THL ist ein amphiphiler Inhibitor, der sogar in Gegenwart von Gallensäure-Salzen mit Triglycerid assoziiert ist – eine entscheidende

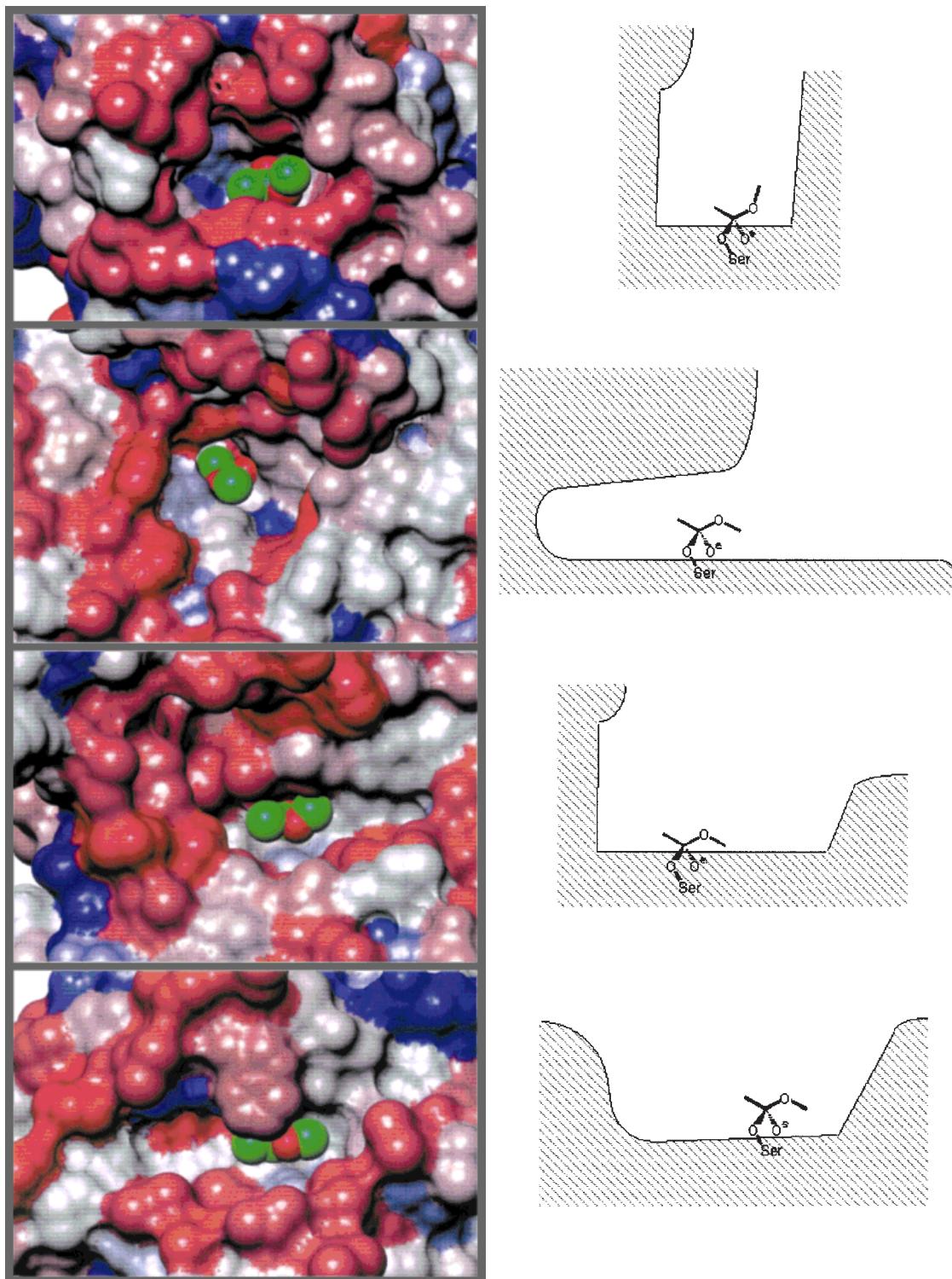


Abb. 6. Die Polarität und Geometrie der Substratbindungsstellen von Lipasen unterscheiden sich nachhaltig. Von oben: Lipasen aus *Candida antarctica* (Typ B), *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizomucor miehei*. Links: Darstellung als Kalottenmodell (Aufsicht), Farbgebung wie in Abb. 2. Zum Vergleich wurde die Bindung des tetraedrischen Übergangszustands bei der Hydrolyse von Essigsäureethylester an die Enzyme modelliert, wobei auf Röntgenstrukturanalyse mit substratalogenen Inhibitoren zurückgegriffen wurde. Rechts: Darstellung des Querschnitts des aktiven Zentrums in der Nachbarschaft des aktiven Serinrestes als „Conolly-Oberfläche“.

Synthese noch rar. Ein Beispiel bezieht sich auf die Modifikation von Lipase aus *Rhizopus delemar*: Durch Mutagenese der Reste F95, F112, V206 und V209 konnte die Kettenlängenspezifität des Enzyms gegenüber Triglyceriden beeinflusst werden.<sup>[196]</sup>

#### 8.2.1. Kombinatorisches Design

Im Hinblick auf ihre zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten sind Lipasen interessante Kandidaten für Versuche zur Erhöhung der Stabilität oder zur Veränderung der Substrat-

Tabelle 14. Durch Protein-Engineering verbesserte Lipasen.

Stamm	Verwendung	Effekt der Mutation	Lit.
<i>Humicola lanuginosa</i>	Waschmittelzusatz	Verbesserung der Waschleistung Erhöhung der Thermostabilität Verbesserung der Stabilität gegenüber Proteasen Erhöhung der spezifischen Aktivität	[187] [188] [189]
<i>Pseudomonas glumae</i>	Waschmittelzusatz	Verbesserung der Stabilität gegen oxidative Denaturierung, Verbesserung der Stabilität gegenüber Proteasen	[190] [191]
<i>Pseudomonas mendocina/putida</i> ATCC 53552	Persäure-Bildung in Waschmitteln	Verbesserung der Substratspezifität Verbesserung der Perhydrolyse- im Vergleich zur Hydrolysegeschwindigkeit	[192] [193]
<i>Pseudomonas</i> <i>pseudo alcaligenes</i>	Waschmittelzusatz	Verbesserung der Waschleistung, erhöhte Stabilität gegenüber anionischen Tensiden	[194] [195]
<i>Rhizopus delemar</i>	Biokatalyse	Änderung der Kettenlängenspezifität	[196]
<i>Pseudomonas mendocina</i> SD702	Waschmittel, Nahrungsmittel und Papier	Verbesserung der Thermostabilität	[197]

spezifität durch kombinatorisches Design. Die Esterase-Aktivität der *Rhizomucor-miehei*-Lipase konnte auf diesem Weg bereits verbessert werden.<sup>[198]</sup> Man darf sicher davon ausgehen, daß die Erfolge bei der Verbesserung der Lösungsmittelstabilität einer Protease<sup>[184]</sup> oder bei Veränderungen der Substratspezifität<sup>[198–201]</sup> in naher Zukunft auch auf Lipasen unter Verwendung kombinatorischer Methoden übertragen werden und die Einsatzmöglichkeiten für diesen Enzymtyp bei industriellen Prozeßen erweitern.

R.D.S. dankt Prof. Dr. Kurt Faber, Universität Graz, sowie Dr. Wilhelm Tischer, Boehringer-Mannheim, Penzberg, für eine kritische Durchsicht des Manuskripts, Masayasu Kawashima, Itopia, Japan, für hilfreiche Diskussionen, seiner Arbeitsgruppe, besonders Dipl.-Chem. Markus Enzelberger und Dipl.-Chem. Frank Zocher sowie Dr. Uwe Bornscheuer und Dr. Jürgen Pleiss, für die Hilfe bei der Erstellung und der Korrektur des Manuskripts sowie dem Fonds der Chemischen Industrie und der Europäischen Union (BIO2-CT96-3041) für finanzielle Unterstützung. R.V. dankt der Arbeitsgruppe in Marseille, insbesondere Dr. Frédéric Carrière und Dr. Claude Rivière, für ihre Hilfe bei der Erstellung der Grafiken sowie der Europäischen Union (BIO2-CT94-3041 und BIO2-CT94-3013) und dem CNRS (Projekt IMABIO) für finanzielle Unterstützung. Beide Autoren danken der Europäischen Union für umfangreiche finanzielle Unterstützung im Rahmen des Lipase-BRIDGE-Projekts.

Eingegangen am 14. April 1997 [A225]

- [1] *Enzyme Nomenclature* (Hrsg.: International Union of Biochemistry and Molecular Biology), Academic Press, New York, 1992.
- [2] P. Wooley, S. B. Petersen, *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application*, Cambridge University Press, Cambridge, 1994.
- [3] F. D. Gunstone, J. L. Harwood, F. B. Padley, *The Lipid Handbook*, Chapman & Hall, London, 1995.
- [4] *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*, GBF Monographs, Vol. 16 (Hrsg.: L. Alberghina, R. D. Schmid, R. Verger), VCH, Weinheim, 1991.
- [5] H. Brockerhoff, R. G. Jensen, *Lipolytic Enzymes*, Academic Press, New York, 1974.
- [6] B. Borgström, H. L. Brockman, *Lipases*, Elsevier, Amsterdam, 1984.
- [7] M. Waite in *The Phospholipases*, Vol. 5 (Hrsg.: D. J. Hanahn), Plenum, New York, 1987.

- [8] *Phospholipases, Methods Enzymology*, Vol. 197 (Hrsg.: E. A. Dennis), Academic Press, New York, 1991.
- [9] *Engineering of/with Lipases* (Hrsg.: F. X. Malcata), Kluwer, London, 1996.
- [10] *J. Mol. Catal. B* 1997, 3 (Sonderheft zum Thema „Mikrobielle Lipasen in der Biokatalyse“).
- [11] B. Rubin, *Structural Biology* 1994, 1, 568–572.
- [12] P. E. Sonnet, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1988, 65, 900–904.
- [13] *Methods in Enzymology*, Vol. 284 (Hrsg.: B. Rubin, E. A. Dennis), Academic Press, San Diego, 1997.
- [14] C.-S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem.* 1989, 101, 711–724; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1989, 28, 695–708.
- [15] A. L. Gutman, M. Shapira in *Synthetic Applications of Enzymatic Reactions in Organic Solvents*, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., Vol. 52 (Hrsg.: A. Fiechter), Springer, Heidelberg, 1995, S. 87–128.
- [16] K. E. Jaeger, S. Ransac, B. W. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel, O. Misset, *FEMS Microbiol. Rev.* 1994, 15, 29–63.
- [17] E. J. Gilbert, *Enzyme Microb. Technol.* 1993, 15, 634–645.
- [18] S. Wohlfahrt, K. E. Jaeger, *BioEngineering* 1993, 9, 39–46.
- [19] A. H. C. Huang in Lit. [6], S. 419–442.
- [20] K. D. Mukherjee, M. J. Hills in Lit. [2], S. 49–76.
- [21] F. Carrière, Y. Gargouri, H. Moreau, S. Ransac, E. Rogalska, R. Verger in Lit. [2], S. 181–205.
- [22] F. Carrière, S. Bezzine, R. Verger in Lit. [10], S. 55–64.
- [23] E. Boel, T. Christensen, H. Woldike (Novo Nordisk AS), US-A 5536661, 1996 [*Chem. Abstr.* 1996, 125, 160364].
- [24] M. M. Soumanou, U. T. Bornscheuer, U. Menge, R. D. Schmid, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997, 74, 427–433.
- [25] H. K. Weber, H. Stecher, K. Faber in *Preparative Biotransformations: Some Properties Of Commercially Available Crude Lipase Preparations* (Hrsg.: S. M. Rakels), Wiley, New York, 1995.
- [26] M. R. Aires-Barros, M. A. Taipa, J. M. S. Cabral in *Isolation And Purification Of Lipases* (Hrsg.: P. Wooley, S. B. Petersen), Cambridge University Press, Cambridge, 1994, S. 243–270.
- [27] S. Ransac, F. Carrière, E. Rogalska, R. Verger, F. Marguet, G. Buono, E. P. Melo, J. M. S. Cabral, M.-P. E. Egloff, H. van Tilburgh, C. Cambillau in *The Kinetics, Specificities And Structural Features Of Lipases, Nato ASI Series*, Vol. H 96 (Hrsg.: J. A. F. Op den Kamp), Springer, Berlin, 1996, S. 265–304.
- [28] K. Isobe, K. Nokihara, S. Yamaguchi, T. Mase, R. D. Schmid, *Eur. J. Biochem.* 1992, 203, 233–237.
- [29] R. Verger, *Trends Biotechnol.* 1997, 15, 32–38.
- [30] R. Verger, *TIBTECH* 1997, 15, 32–38.
- [31] J. G. T. Kierkels, L. F. W. Vlengels, E. T. F. Gelade, D. P. Vermeulen, J. Kamphuis, C. Wandrey, W. J. J. van den Tweel, *Enzyme Microbiol. Technol.* 1994, 16, 513–521.
- [32] M. M. Momsen, M. Dahim, H. L. Brockman, *Biochemistry* 1997, 36, 10073–10081.
- [33] S. Ransac, M. G. Ivanova, R. Verger, I. Panaiotov in *Methods in Enzymology*, Vol. 286 (Hrsg.: B. Rubin, E. A. Dennis), Academic Press, San Diego, 1997.
- [34] G. Piéroni, Y. Gargouri, L. Sarda, R. Verger, *Adv. Colloid Interface Sci.* 1990, 32, 341–378

- [35] L. de la Fournière, M. G. Ivanova, J. P. Blond, F. Carrière, R. Verger, *Colloids Surf. B* **1994**, *2*, 585–593.
- [36] W. E. Momsen, M. M. Momsen, H. L. Brockman, *Biochemistry* **1995**, *34*, 7271–7281.
- [37] W. Nitsch, R. MakSYMiw, H. Erdmann, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *141*, 322–328.
- [38] L. Sarda, P. Desnuelle, *Biochim. Biophys. Acta* **1958**, *30*, 513–521.
- [39] F. K. Winkler, A. D'Arcy, W. Hunziker, *Nature* **1990**, *343*, 771–774.
- [40] L. Brady, A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Huge-Jensen, L. Norskov, L. Thim, U. Menge, *Nature* **1990**, *343*, 767–770.
- [41] A. M. Brzozowski, U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Huge-Jensen, S. A. Patkar, L. Thim, *Nature* **1991**, *351*, 491–494.
- [42] B. Nieuwenhuis in *The CEC Bridge Lipase Project* (Hrsg.: L. Alberghina, R. D. Schmid, R. Verger), VCH, Weinheim, **1990**, S. 3–6.
- [43] M. E. M. Noble, A. Cleasby, L. N. Johnson, L. G. J. Frenken, M. R. Egmond, *FEBS Lett.* **1993**, *331*, 123–128.
- [44] J. Uppenberg, M. T. Patkar, S. Hansen, A. Jones, *Structure* **1994**, *2*, 293.
- [45] H. van Tilbeurgh, M.-P. Egloff, C. Martinez, N. Rugani, R. Verger, C. Cambillau, *Nature* **1993**, *362*, 814–819.
- [46] K. Thirstrup, R. Verger, F. Carrière, *Biochemistry* **1994**, *33*, 2748–2756.
- [47] A. Hjorth, F. Carrière, C. Cudrey, H. Wöldike, E. Boel, D. M. Lawson, F. Ferrato, C. Cambillau, G. G. Dodson, L. Thim, R. Verger, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4702–4707.
- [48] P. Grochulski, Y. Li, J. D. Schrag, F. Bouthillier, P. Smith, D. Harrison, B. Rubin, M. Cygler, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 12843–12847.
- [49] J. D. Schrag, M. Cygler, *J. Mol. Biol.* **1993**, *230*, 575.
- [50] U. Derewenda, L. Swenson, R. Green, Y. Wei, G. G. Dodson, S. Yamaguchi, M. J. Haas, Z. S. Derewenda, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 36–47.
- [51] C. Martinez, P. de Geuss, M. Lauwerys, G. Matthysse, C. Cambilleau, *Nature* **1992**, *356*, 615–618.
- [52] J. D. Schrag, Y. Li, M. Cygler, D. Lang, T. Burgdorf, H. J. Hecht, R. D. Schmid, L. C. Strickland, S. B. Larson, J. Day, A. Mc Pherson, *Structure* **1997**, *5*, 187–202.
- [53] D. L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolov, S. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, *Protein Eng.* **1992**, *5*, 197–211.
- [54] U. Derewenda, Z. S. Derewenda, *Biochem. Cell. Biol.* **1991**, *69*, 842–851.
- [55] Z. S. Derewenda, A. M. Sharp, *TIBS* **1993**, *18*, 20–25.
- [56] F. Carrière, J. A. Barrowan, R. Verger, R. Laugier, *Gastroenterology* **1993**, *105*, 876–888.
- [57] G. Scheele, H. Kern in *The exocrine pancreas, Molecular and cellular basis of digestion* (Hrsg.: P. Desnuelle), Elsevier, Amsterdam, **1986**, S. 173–192.
- [58] Q. Lüthi-Peng, F. K. Winkler, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *205*, 383–390.
- [59] M. P. Egloff, F. Buono, R. Marguet, R. Verger, C. Cambillau, H. van Tilbeurgh, *Biochemistry* **1995**, *34*, 2751–2762.
- [60] *Encyclopaedia of Chemical Technology* (Hrsg.: R. E. Kirk, D. F. Othmer), Wiley, New York, **1978**.
- [61] W. Connstein, E. Hoyer, H. Wartenberg, *Chem. Ber.* **1902**, *34*, 3988–4006.
- [62] N. O. V. Sonntag in *Baileys Industrial Oil and Fat Products* (Hrsg.: D. Swern), Wiley, New York, **1982**, S. 97–111.
- [63] R. Hashizume, Y. Tanaka, T. Funada (Nippon Oil and Fats Co.), JPA A 03019693 A2, **1991** [Chem. Abstr. **1991**, *115*, 90690].
- [64] H. Moore (Unilever PLC), GB-B 2185990 A1, **1987** [Chem. Abstr. **1987**, *107*, 174780].
- [65] P. M. J. Holemans, R. Schijf, K. P. A. M. van Putte, T. de Mans (Unilever N.V.; Unilever PLC), EP-B 209176 A1, **1987** [Chem. Abstr. **1987**, *106*, 118502].
- [66] S. Bloomer, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, *67*, 519–524.
- [67] A. R. Macrae, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1983**, *60*, 291–294.
- [68] M. H. Coleman, A. R. Macrae (Unilever N.V.), DE-B 2705608, **1977** [Chem. Abstr. **1977**, *87*, 166366].
- [69] T. Matsuo, N. Sawamura, Y. Hashimoto, W. Hashida (Fuji Oil Co.), EP-B 0035883 A2, **1982** [Chem. Abstr. **1982**, *96*, 4958y].
- [70] C. C. Akoh, *INFORM* **1995**, *6*, 1055–1061.
- [71] B. Ö. Gudmundsson, Ö. Almarsson, G. G. Haraldsson, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5791–5794.
- [72] H. Baumann, M. Bühler, H. Fochem, F. Hirsinger, H. Zoebelie, J. Falbe, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 41–62; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 41–62.
- [73] N. O. V. Sonntag, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1982**, *59*, 795A–802A.
- [74] U. T. Bornscheuer, *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, *17*, 578–586.
- [75] S. Moore, P. Quinlan, *INFORM* **1993**, *4*, 579–583.
- [76] V. Partali, L. Kvittingen, H.-R. Sliwka, T. Anthonsen, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 342–344; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 329–330.
- [77] A. M. Wolff, M. S. Showell in *Enzymes in Detergency* (Hrsg.: J. H. Van Ee, O. Misset, E. J. Baas), Marcel Dekker, New York, **1997**, S. 93–106.
- [78] O. Misset in Lit. [77], S. 107–132.
- [79] E. Gormsen, M. Lykke, C. F. Jensen, *Rev. Quim. Text.* **1994**, *120*, 78–81.
- [80] B. Kottwitz, H. Upadek, G. Carrer, *Chim. Oggi* **1994**, *12*, 21–24.
- [81] O. Kirk, M. W. Christensen, T. Damhus, S. E. Godtfredsen, *Biocatalysis* **1994**, *11*, 65–77.
- [82] H. Andree, R. W. Müller, R. D. Schmid, *J. Appl. Biochem.* **1980**, *2*, 218–229.
- [83] Y. Fujita, H. Awaji, M. Matsukura, K. Hata, H. Shimoto, M. Sharyo, H. Skaguchi, K. Gibson, *Tappi J.* **1992**, *75*, 117–122.
- [84] E. N. Vulson in Lit. [2], S. 271–286.
- [85] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Heidelberg, **1995**.
- [86] K. Drauz, H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH, Weinheim, **1995**.
- [87] R. A. Sheldon, *Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds*, Marcel Dekker, New York, **1993**.
- [88] R. Kazlauskas, U. T. Bornscheuer in *Biotechnology*, Vol. 8a (Hrsg.: H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. J. W. Stadler, D. R. Kelly), VCH, Weinheim, **1998**, S. 37–191.
- [89] K. Faber, *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 1613–1632.
- [90] A. M. P. Koskinen, A. M. Klibanov, *Enzymatic Reactions in Organic Media*, Blackie, London, **1996**.
- [91] H. P. Kaufmann, M. C. Keller, *Fette Seifen* **1937**, *44*, 105–107.
- [92] H. P. Kaufmann, M. C. Keller, *Fette Seifen* **1937**, *44*, 42–47.
- [93] J. S. Dordick, *Biotechnol. Prog.* **1992**, *8*, 259–267.
- [94] M. N. Gupta, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *203*, 25–32.
- [95] E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 367–381.
- [96] F. Effenberger, B. Gutterer, T. Ziegler, E. Eckhardt, R. Aichholz, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, *47*–54.
- [97] M. Schneider, E. H. Reimerdes, *Forum Mikrobiol.* **1987**, *65*–71.
- [98] F. Theil, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2203–2227.
- [99] K. Mori, *Synlett* **1995**, 1097–1109.
- [100] C. H. Wong, J. M. Fang, *Synlett* **1994**, 393–402.
- [101] A. L. Margolin, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 266–279.
- [102] C. Froessl, M. Lorenz, W. Boland, *Synthesis* **1991**, 1049–1072.
- [103] G. M. Whitesides, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 617–620; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 617–620.
- [104] H. P. Schär, X. F. Busquets, O. Ghisalba, G. M. R. Tombo, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5707–5710.
- [105] E. L. A. Mac Farlane, S. N. Roberts, N. J. Turner, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1990**, 569–571.
- [106] C. S. Chen, Y. Fujimoto, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294–7299.
- [107] C. S. Chen, S. H. Wu, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2812–2817.
- [108] M. Castaing-Degueil, B. de Jeso, S. Drouillard, B. Maillard, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 953–954.
- [109] Y. F. Wang, J. J. Lalonde, M. Momongan, D. E. Bergbreiter, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7200–7205.
- [110] H. M. R. Hoffmann, U. T. Bornscheuer, T. F. J. Lampe, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 2889–2900.
- [111] R. Kazlauskas, A. N. E. Weissflock, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656–2665.
- [112] P. Grochulski, F. Bouthillier, R. Kazlauskas, A. N. Serreqi, J. D. Schrag, E. Ziomek, M. Cygler, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3494–3500.

- [113] R. Bovara, G. Carrea, L. Ferrara, S. Riva, *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 931–938.
- [114] R. Chenevert, R. Pouliot, P. Bureau, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2941–2944.
- [115] S. J. Phythian, A. J. Reason, S. M. Roberts, N. B. Bashir, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 2203–2222.
- [116] C. H. Wong, *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 1609–1616.
- [117] J. Chopineau, A. P. G. Kieboom, A. M. Klipanov, S. Riva, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 584–589.
- [118] M. Therisod, A. M. Klipanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5638–5640.
- [119] R. Pulido, V. Gotor, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 491–492.
- [120] C. Scheckermann, A. Schlotterbeck, M. Schmid, *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, *17*, 157–162.
- [121] A. M. Klipanov, M. Therisod, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3977–3981.
- [122] S. Riva, F. Secundo, L. Zucchelli, F. Nicotra, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1703–1704.
- [123] R. Pulido, F. O. López, V. Gotor, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 2981–2988.
- [124] A. E. M. Janssen, C. Klabbers, M. C. R. Franssen, K. van't Reit, *Enzym. Microb. Technol.* **1991**, *13*, 565–571.
- [125] L. Cao, A. Fischer, U. T. Bornscheuer, R. D. Schmid, *Biocatal. Biotrans.* **1997**, *14*, 269–283.
- [126] B. Morgan, A. C. Oehlschlager, T. M. Stokes, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3231–3236.
- [127] H. Edlund, P. Berglund, M. Jensen, E. Hedenstroem, H. E. Hoegberg, *Acta Chim. Scand.* **1996**, *50*, 666–671.
- [128] A. L. Margolin, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6797.
- [129] L. Salazar, C. J. Sih, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 2917–2920.
- [130] M. M. Enzelberger, U. T. Bornscheuer, I. Gattfield, R. D. Schmid, *J. Biotechnol.* **1997**, *56*, 129–134.
- [131] A. L. Gutman, T. Bravdo, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4263–4265.
- [132] F. Theil, H. Schick, G. Winter, G. Reck, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 7569–7582.
- [133] C. R. Johnson, A. Golebiowski, D. H. Steensma, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9414–9418.
- [134] V. Sunjic, *Croat. Chem. Acta* **1994**, *67*, 365–392.
- [135] C. Andreu, J. A. Macro, G. Asensio, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, 3209–3210.
- [136] S. Takano, M. Moriya, Y. Higashi, K. Ogasawara, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1993**, 177–178.
- [137] S. Puertas, R. Brieva, F. Rebollo, V. Gotor, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 4007–4014.
- [138] R. Brieva, F. Rebollo, V. Gotor, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1386–1387.
- [139] A. L. Gutman, E. Meyer, X. Yue, C. Abell, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3943–3946.
- [140] M. C. de Zoete, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon (Delft University of Technology), WO-A 9507359 A1, **1995** [*Chem. Abstr.* **1995**, *122*, 31055].
- [141] M. C. de Zoete, A. C. Kock-van Dalen, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1831–1832.
- [142] M. C. de Zoete, A. C. Kock-van Dalen, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Biocatalysis* **1994**, *10*, 307–316.
- [143] M. C. de Zoete, F. van Rantwijk, L. Maat, R. A. Sheldon, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1993**, *112*, 462–463.
- [144] N. Baba, M. Mimura, J. Hiratake, K. Uchida, J. Oda, *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 2685–2687.
- [145] E. Guibe-Jampel, M. Bassir, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 421–422.
- [146] J. Z. Crich, R. Brieva, P. Marquart, R. L. Gu, S. Flemming, C. J. Sih, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3252–3258.
- [147] M. Bucciarelli, A. Forni, I. Moretti, F. Prati, G. Torre, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 903–906.
- [148] P. Cesti, D. Bianchi, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5657–5659.
- [149] J. M. Chong, K. M. Mar, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5683–5686.
- [150] S. Kurita, S. Ueji, T. Yamada, S. Kuwata, T. Miyazawa, *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 941–946.
- [151] G. Nicolosi, R. Morrone, A. Patti, M. Piatelli, *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 753–758.
- [152] K. Nakamura, K. Ishihara, A. Ohno, M. Uemura, H. Nishimura, Y. Hayashi, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3603–3604.
- [153] L. A. Hulshof, J. H. Roskam (Stamicarbon B.V.), EP-B 343714 A1, **1989** [*Chem. Abstr.* **1990**, *113*, 76603].
- [154] K. Wünsche, U. Schwaneberg, U. T. Bornscheuer, H. H. Meyer, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 2017–2022.
- [155] M. Kloosterman, V. H. M. Elferink, J. van Iersel, J. H. Roskam, E. M. Meijer, L. A. Hulshof, R. A. Sheldon, *TIBTECH* **1988**, *6*, 251–256.
- [156] S. Mitsuda, S. Nabeshima, H. Hirohara, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989**, *31*, 334–337.
- [157] C. S. Chen, S. Hsiung, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2812–2817.
- [158] D. Bianchi, T. Sugai, H. Ohta, *Agric. Biol. Chem.* **1991**, *55*, 293–294.
- [159] P. Cesti, E. Battistel, D. Bianchi, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5531–5534.
- [160] S. Brandt, R. F. Rossi, D. R. Dodds, J. L. Lopez (Sepracor Inc.), WO-A 9004643 A1, **1990** [*Chem. Abstr.* **1990**, *113*, 76620].
- [161] T. Shibatani, Yukagaku **1995**, *44*, 862–868 [*Chem. Abstr.* **1995**, *123*, 312256].
- [162] H. R. Sonawane, N. S. Bellur, J. R. Ahuya, D. G. Kulkarni, *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 163–192.
- [163] D. Bianchi, W. Cabri, P. Cesti, F. Francalanci, M. Ricci, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 104–107.
- [164] J. M. Moreno, J. V. Sinisterra, *J. Mol. Catal. A* **1995**, *98*, 171–184.
- [165] S. Mitsuda, S. Nabeshima, H. Hirhara, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989**, *31*, 334–337.
- [166] F. Balkenhohl, K. Ditrich, B. Hauer, W. Ladner, *J. Prakt. Chem.* **1997**, *339*, 381–384.
- [167] D. L. Hughes, J. J. Bergan, J. S. Amato, P. J. Reider, E. J. J. Grabowski, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1787–1788.
- [168] S. Hamaguchi, M. Asada, J. Hasegawa, K. Watanabe, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 1661–1667.
- [169] R. L. Rizek, B. Friend, L. Page, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1974**, *51*, 244–250.
- [170] M. Hamosh, D. Ganot, P. Hamosh, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 12121–12125.
- [171] M. Aoubala, I. Douchet, R. Laugier, M. Hirn, R. Verger, A. de Caro, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1169*, 183–189.
- [172] C. Tiruppathi, K. A. Balasubramanian, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *712*, 692–697.
- [173] J. de Caro, F. Ferrato, R. Verger, A. de Caro, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1252*, 321–329.
- [174] H. Moreau, Y. Gargouri, D. Lecat, R. Verger, J. L. Junien, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *960*, 286–293.
- [175] F. Carrière, H. Moreau, V. Raphael, R. Laugier, C. Bénicourt, J. L. Junien, R. Verger, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *202*, 75–83.
- [176] C. K. Abrams, M. Hamosh, V. S. Hubbard, S. K. Datta, P. Hamos, *J. Clin. Invest.* **1984**, *73*, 374–382.
- [177] Y. Gargouri, H. Moreau, R. Verger, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *1006*, 255–271.
- [178] A. Suzuki, A. Mizumoto, M. J. Sarr, E. P. Dimagno, *Gastroenterology* **1997**, *112*, 2048–2055.
- [179] C. Wicker-Planquart, S. Canaan, M. Rivière, L. Dupuis, R. Verger, *Protein Eng.* **1996**, *9*, 1225–1232.
- [180] F. Carrière, H. Moreau, V. Raphael, R. Laugier, C. Bénicourt, J. L. Junien, R. Verger, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *202*, 75–83.
- [181] C. Bénicourt, C. Blanchard, F. Carrière, R. Verger, J. L. Junien in *Clinical Ecology of Cystic Fibrosis* (Hrsg.: H. Escobar, C. F. S. Baquero), Elsevier, Amsterdam, **1993**, S. 291–295.
- [182] P. Hadváry, H. Lengsfeld, H. Wolfer, *Biochem. J.* **1988**, *256*, 357–361.
- [183] B. Borgstrom, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *962*, 308.
- [184] P. Hadváry, W. Sidler, W. Meister, W. Vetter, H. Wolfer, *FEBS Lett.* **1992**, *299*, 111–115.
- [185] C. Cudrey, H. van Tilbeurgh, Y. Gargouri, R. Verger, *Biochemistry* **1993**, *32*, 13800–13808.
- [186] S. Ransac, Y. Gargouri, F. Marguet, G. Buono, C. Beglinger, P. Hildebrand, H. Lengsfeld, P. Hadváry, R. Verger in Lit. [33], S. 190–231.
- [187] A. Svendsen, I. G. Clausen, S. A. Patkar, E. Gormsen (Novo Nordisk), WO-A 9205249 A1, **1992** [*Chem. Abstr.* **1993**, *118*, 35131].
- [188] A. Svendsen, I. G. Clausen, S. A. Patkar, E. Gormsen (Novo Nordisk), WO-A 9311254 A1, **1993** [*Chem. Abstr.* **1993**, *119*, 176669].

- [189] A. Svendsen, I. G. Clausen, S. A. Patkar, E. Gormsen (Novo Nordisk), WO-A 9425577 A1, **1994** [*Chem. Abstr.* **1995**, *122*, 155213].
- [190] A. M. Batenburg, M. R. Egmond, L. G. J. Frenken, C. T. Verrrips (Unilever PLC), EP-B 407225 A1, **1991** [*Chem. Abstr.* **1991**, *115*, 25076].
- [191] M. L. F. Giuseppin, M. T. S. Lopes, R. J. Planta, J. M. A. Verbakel, C. T. Verrrips (Unilever PLC), WO-A 9100920 A2, **1991** [*Chem. Abstr.* **1991**, *115*, 134185].
- [192] A. J. Poulose, S. A. Anderson (Clorox Co.), EP-B 375102 A2, **1990** [*Chem. Abstr.* **1990**, *113*, 174516].
- [193] G. L. Gray, S. D. Scott, A. J. Ayrookaran (Genencor Inc.) US-A 5389536 A, **1995** [*Chem. Abstr.* **1995**, *122*, 234312].
- [194] J. M. Van der Laan, H. B. M. Lenting, L. J. S. M. Mullenens, M. M. J. Cox (Gist-Brocades N.V.), WO-A 9425578 A1, **1994** [*Chem. Abstr.* **1995**, *122*, 127550x].
- [195] W. Aehle, G. Gerritse, H. B. M. Lenting (Gist-Brocades B.V.), WO-A 9530744 A2, **1995** [*Chem. Abstr.* **1996**, *124*, 110997s].
- [196] R. D. Joerger, M. J. Haas, *Lipids* **1994**, *29*, 377–384.
- [197] T. Yoneda, Y. Miyota, K. Ohno, J. Sasuga (Showa Denko), WO-A 9514783 A1, **1995** [*Chem. Abstr.* **1995**, *123*, 221785].
- [198] D. J. H. Gaskin, A. H. Bovagnet, N. A. Turner, E. N. Vulfson, *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, *25*, 158.
- [199] J. C. Moore, F. H. Arnold, *Nature Biotechnol.* **1996**, *14*, 458–467.
- [200] D. L. Mc Beth, B. Hauer, *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 3538–3540.
- [201] Anmerkung bei der Korrektur (13. Mai 1998): Seit Fertigstellung des Manuskripts vor einem Jahr hat die Zahl der Veröffentlichungen über Lipasen erwartungsgemäß in nahezu allen hier angesprochenen Bereichen der Grundlagenforschung und der Anwendungen zugenommen. Ein erstes Beispiel für das „evolutive Design“ von Lipasen im Hinblick auf eine höhere Enantioselektivität wurde für das Enzym aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 beschrieben: M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2961–2963; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2830–2832.