

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Lipasen .....	3
1.2	Esterasen .....	9
1.3	Unterscheidungsmerkmale zwischen Lipasen und Esterasen .....	11
1.4	Berechnung der Enantioselektivität.....	12
1.5	Einfluß verschiedener Reaktionsparameter auf die Biokatalyse .....	14
1.5.1	Einfluß des Lösungsmittels .....	14
1.5.2	Auswahl des Acyldonors .....	17
1.5.3	Einfluß des Trägermaterials .....	18
1.5.4	Rolle des Wassergehaltes bzw. der Wasseraktivität.....	19
1.6	Gerichtete Evolution von Enzymen.....	20
1.7	Zielsetzung der Arbeit .....	26
<b>2</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
2.1	Lipidmodifikationen .....	27
2.1.1	Monoacylglyceride .....	27
2.1.1.1	Synthese von Monoacylglyceriden durch Glycerolyse im Festphasensystem .....	29
2.1.1.1.1	Auswahl der Lipase für die Glycerolyse von Triolein .....	31
2.1.1.1.2	Einfluß der Reinheit und der Immobilisierung.....	35
2.1.1.1.3	Einfluß der Temperatur .....	36
2.1.1.1.4	Einfluß der Enzymkonzentration.....	37
2.1.1.1.5	Umsetzungen natürlicher Fette und Öle .....	38
2.1.1.1.6	Isolierung der Monoacylglyceride.....	40
2.1.1.2	Synthese von Monoacylglyceriden aus (geschützten) Glyceriden mit Vinylestern .....	42
2.1.1.2.1	Acylierung von Glycerin und Isopropylidenglycerin mit Fettsäurevinylestern .....	42
2.1.1.2.2	Untersuchungen zur Stereoselektivität .....	46
2.1.1.2.2.1	Einfluß des Trägermaterials auf die Stereoselektivität.....	47
2.1.1.2.2.2	Einfluß der Substratstruktur .....	48
2.1.1.2.2.3	Einfluß der Temperatur .....	50
2.1.2	Synthese von 2-Monoacylglyceriden zur Darstellung strukturierter Triacylglyceride ...	51
2.1.2.1	Strukturierte Triacylglyceride .....	51
2.1.2.2	Synthese strukturierter Triacylglyceride aus mittel- und langkettigen Fettsäuren durch das Zweischrittverfahren .....	53
2.1.2.3	Synthese von 1,3-Oleyl-2-palmitoylglycerin durch das Zweischrittverfahren .....	56
2.1.3	Zusammenfassung .....	57

2.2	Racematspaltung von 3-Hydroxyestern zur Synthese von 8-Blockern .....	59
2.2.1	Synthese racemischer 3-Hydroxyester .....	60
2.2.2	Lipase-katalysierte Racematspaltung von 3-Hydroxyestern .....	61
2.2.3	Formale Synthese von (S)-Propranolol .....	63
2.2.4	Lipase-katalysierte Racematspaltung aliphatischer 3-Hydroxyester in überkritischem Kohlendioxid .....	64
2.2.5	Zusammenfassung .....	66
2.3	Asymmetrisierung von <i>meso</i> -Verbindungen zur Synthese eines Bryostatin-Fragmentes .....	68
2.3.1	Auswahl des Enzyms und Optimierung der Reaktionsbedingungen .....	69
2.3.2	Variation der Substratstruktur .....	70
2.3.3	Zusammenfassung .....	71
2.4	Gerichtete Evolution einer Esterase zur Synthese eines Epothilon-Bausteins .....	72
2.4.1	Expression, Aufreinigung und biochemische Charakterisierung der Esterase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> I .....	73
2.4.1.1	Konstruktion des Plasmides pJOE2792 .....	73
2.4.1.2	Produktion und Aufreinigung der Esterase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> I .....	74
2.4.1.3	Aktivität, Stabilität, Substratspezifität und Stereoselektivität der Esterase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> I .....	76
2.4.2	Gerichtete Evolution.....	81
2.4.2.1	Erzeugung einer Enzybibliothek .....	81
2.4.2.2	Testsystem und Screening .....	82
2.4.3	Zusammenfassung .....	86
2.5	Lacton-spezifische Esterase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> II .....	87
2.5.1	Klonierung eines Esterase-Gens aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM50106 .....	88
2.5.2	Produktion, Isolierung und Aufreinigung der Esterase aus <i>Ps. fluorescens</i> II .....	91
2.5.3	Lipase-katalysierte Racematspaltung von $\gamma$ - und $\delta$ -Lactonen .....	96
2.5.4	Zusammenfassung .....	99
3	<b>Diskussion und Ausblick.....</b>	<b>101</b>
3.1	Lipase-katalysierte Synthese von Monoacylglyceriden .....	101
3.2	Darstellung strukturierter Triacylglyceride .....	102
3.3	Lipase-katalysierte Darstellung optisch reiner Bausteine .....	103
3.3.1	Untersuchungen zur stereoselektiven Umsetzung primärer Alkohole .....	103
3.3.2	Untersuchungen zur stereoselektiven Umsetzung sekundärer Alkohole .....	106

3.3.3	Racematspaltung von Lactonen.....	107
3.4	Gerichtete Evolution.....	108
3.5	Lacton-spaltende Esterase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> II.....	109
3.6	Ausblick.....	110
4	<b>Methoden.....</b>	<b>111</b>
4.1	Bakterielle Stämme und Plasmide.....	111
4.2	Techniken zur DNA-Manipulation.....	111
4.3	Screening auf Esterase-Aktivität in der genomischen Bibliothek der <i>P. fluorescens</i> ...	111
4.4	DNA-Sequenzierung .....	112
4.5	Konstruktion des Plasmides pFIS32.....	112
4.6	Expression des <i>estFI</i> -Gens in <i>E. coli</i> und Reinigung der Esterase .....	112
4.7	Elektrophorese.....	113
4.8	Esteraseaktivität.....	113
4.9	Verwendete Lipasen und Esterasen .....	114
5	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>116</b>