

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5657528号
(P5657528)

(45) 発行日 平成27年1月21日(2015.1.21)

(24) 登録日 平成26年12月5日(2014.12.5)

(51) Int.Cl.

C12P 13/02 (2006.01)

F1

C12P 13/02

請求項の数 20 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2011-512918 (P2011-512918)	(73) 特許権者	501073862
(86) (22) 出願日	平成21年5月22日 (2009.5.22)		エボニック デグサ ゲーエムベーハー
(65) 公表番号	特表2011-522551 (P2011-522551A)		Evonik Degussa GmbH
(43) 公表日	平成23年8月4日 (2011.8.4)		ドイツ連邦共和国 エッセン レリングハウザー シュトラーセ 1-11
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/056208		Rellinghauser Strasse 1-11, D-45128 Essen, Germany
(87) 国際公開番号	W02009/150023	(74) 代理人	100079108
(87) 国際公開日	平成21年12月17日 (2009.12.17)		弁理士 稲葉 良幸
審査請求日	平成24年1月27日 (2012.1.27)	(74) 代理人	100109346
(31) 優先権主張番号	102008002410.4		弁理士 大貫 敏史
(32) 優先日	平成20年6月13日 (2008.6.13)	(74) 代理人	100117189
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 江口 昭彦
前置審査			

最終頁に続く

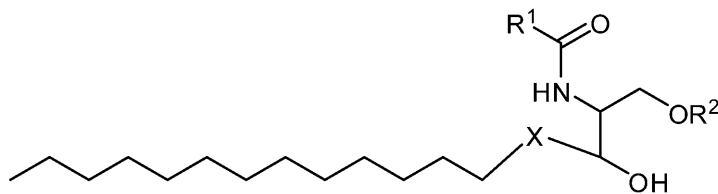
(54) 【発明の名称】 スフィンゴ脂質の酵素的合成

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

一般式 I

【化1】

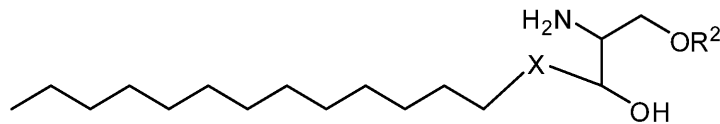


式 I

10

で表されるスフィンゴ脂質の生体触媒的調製方法であって、
一般式 I I

【化 2】



式 II

で表されるリゾスフィンゴ脂質

10

(式中、

R^1 は、天然植物油または動物油をベースとする 6 ~ 30 個の炭素原子を有する天然の脂肪酸から -COOH を除いた基であり、

R^2 は、H、ホスホコリン、エタノールアミン、セリンまたは糖を表し、

X は、 $CH=CH$ 、 CH_2-CH_2 または CH_2-HCOH を表す)

と、少なくとも 1 つのカルボキシルエステルとを、Candida antarctica 由来のリパーゼ B を含む生体触媒の存在下で反応させることによる方法であり、

前記カルボキシルエステルが、少なくとも 1 つのカルボン酸とグリセロールとのエステルであり、ここで前記カルボン酸は、天然植物油または動物油をベースとする 6 ~ 30 個の炭素原子を有する天然の脂肪酸の群から選択されることを特徴とする、方法。

20

【請求項 2】

前記リゾスフィンゴ脂質が、前記酵素反応の前に、前記リゾスフィンゴ脂質の酸付加生成物の脱プロトン化によって調製されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記リゾスフィンゴ脂質の酸付加生成物の脱プロトン化と、生体触媒的調製との間に濾過ステップが行われることを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記リゾスフィンゴ脂質が、生体触媒作用中に、前記リゾスフィンゴ脂質の酸付加生成物の脱プロトン化によって調製されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記リゾスフィンゴ脂質の、カルボン酸カルボキシレート、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、炭酸塩、水酸化物またはハロゲン化物が、前記リゾスフィンゴ脂質の酸付加生成物として使用されることを特徴とする、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 6】

有機塩基または無機塩基が前記脱プロトン化に使用されることを特徴とする、請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

プロトン化後に水を少しも遊離しない塩基が使用されることを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

アルカリ金属アルコラートが塩基として使用されることを特徴とする、請求項 6 または 7 に記載の方法。

40

【請求項 9】

前記リゾスフィンゴ脂質の酸付加生成物と塩基との間のモル比が、10 : 1 ~ 0.05 : 1 の範囲内であることを特徴とする、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

部分グリセリドの含量が、前駆体としての前記カルボキシルエステルの初期重量の質量を基準にして 2.5 % w / w 未満であることを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

50

前記生体触媒の量が、前駆体の全質量を基準にして、1% (w/w) ~ 100% (w/w) の範囲内で使用されることを特徴とする、請求項1 ~ 10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

前記生体触媒が回収されることを特徴とする請求項1 ~ 11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

前記酵素反応の開始時に、リゾスフィンゴ脂質とカルボキシルエステルとのモル比1 : 10 ~ 10 : 1で反応物質が存在することを特徴とする請求項1 ~ 12のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項14】

前記反応が、有機溶剤中で実施されることを特徴とする、請求項1 ~ 13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

カールフィッシャー法で検出される水含量0.100M以下として定義された無水条件下で、前記反応が実施されることを特徴とする、請求項1 ~ 14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

前記反応開始時の前記反応物質濃度が、各反応物質について、0.01M ~ 3Mの範囲内であることを特徴とする、請求項1 ~ 15のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項17】

前記反応温度が、20 ~ 130 の範囲内であることを特徴とする、請求項1 ~ 16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

前記反応が、1 bar未満の圧力下で実施されることを特徴とする、請求項1 ~ 17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

式Iの標的化合物に関連した変換が、理論的に予想される変換の80%超であることを特徴とする、請求項1 ~ 18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

30

式Iおよび0.001 ~ 19質量%の対応するN, O - ジアシル化生成物を含む組成物が得られることを特徴とする、請求項1 ~ 19のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、スフィンゴ脂質の酵素的合成ならびに、リゾスフィンゴ脂質とカルボキシルエステル由来のスフィンゴ脂質を含む組成物に関し、また、こうしたスフィンゴ脂質または組成物を含む化粧品製剤、皮膚用製剤または医薬製剤に関する。

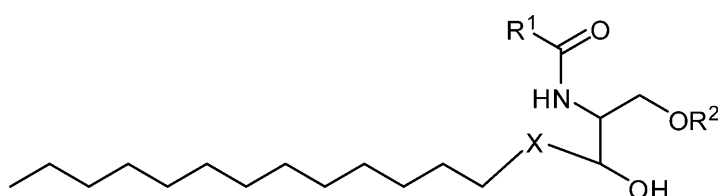
【背景技術】

【0002】

40

本発明は、一般式I

【化1】

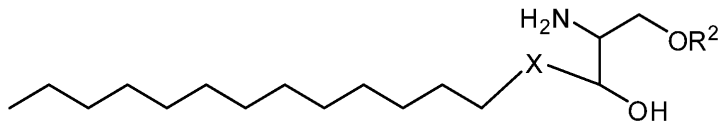


式 I

50

で表されるスフィンゴ脂質の生体触媒的調製方法であって、
一般式 I I

【化 2】

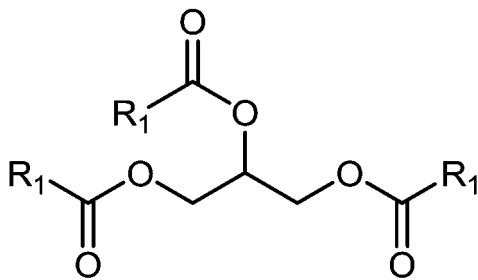


式 II

10

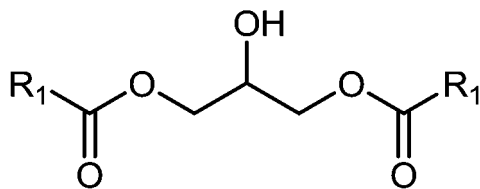
で表されるリゾスフィンゴ脂質を、一般式 I I I a ~ e

【化 3】

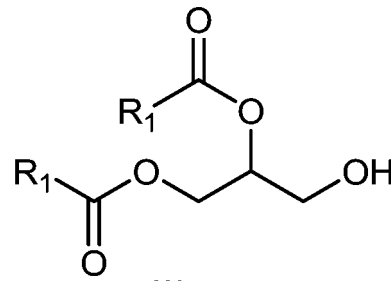


III-a

20

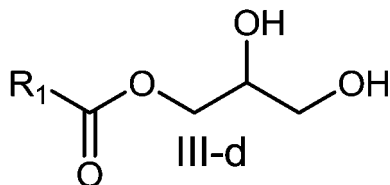


III-b

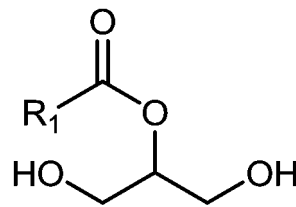


III-c

30



III-d



III-e

40

(ここで、 R^1 、 R^2 および X は以下に定義の通りである)

で表される化合物を含む群から選択される少なくとも1つのカルボキシルエステルと反応させることによる調製方法に関する。

【0003】

本スフィンゴ脂質は、化粧品および/または皮膚用有効成分として使用される。

【0004】

$R^2 = H$ である一般式 I のスフィンゴ脂質は、セラミドと言われ、皮膚(角質層)内に天然に存在する極性脂質である。外側の角質細胞では、セラミドは、細胞膜の主成分(脂質含量の40~65%)に相当し、たとえば、透水性を調節することにより、その保護機

50

能において中心的役割を果たす。加齢とともに、ケラチノサイトは、セラミド合成能の大部分を失い、それ故皮膚はその保護作用の一部を失い、たとえば、もはや表皮の水分喪失を完全に抑制することはできない。これは、セラミドの局所適用によって、少なくとも部分的に補うことができる（たとえば、Farwick, M. et al., Int. J. Cosm. Sci., 2007, 29(4), 319-329またはKlee, S.K. et al. Basic Clinic. Dermatol., 2007, 40, 155-165）。

【0005】

加えて、アトピー性皮膚炎の治療における、セラミドの好ましい作用が報告されている（Kerscher, M. et al., Eur. J. Dermatol., 1991, 1, 39-43; Imokawa, G. et al., J. Soc. Cosmet. Chem. 1989, 40, 500-507）。

10

【0006】

多くの先進工業諸国、特にドイツにおける人口統計推移を考慮すると、セラミドの需要はさらに増大すると予想される。

【0007】

先行技術では、セラミドは、活性化カルボン酸誘導体を使用して、 $R^2 = H$ である一般式 I I のリゾスフィンゴ脂質、たとえば、フィトスフィンゴシン（ $R^2 = H$ かつ $X = CH_2 - HCOH$ である、一般式 I I）等の、ショットテン・バウマン（Schotten Baumann）類似 N - アシル化によって調製される。

【0008】

フィトスフィンゴシンは、一般に発酵起源である。

20

【0009】

活性化カルボン酸は一般に、それ自体として使用されるか、またはカルボン酸からイン・シチュで調製されるかのいずれかである、塩化カルボニルである。米国特許第 6 4 2 0 6 0 4 号（Cosmoferm, NL）は、スフィンゴシン塩基を好適なカルボニルハロゲン化物と反応させることによる、幾つかのセラミドの合成について記述している。この方法の際立った不都合は、有毒な有機塩素化合物を使用する必要性がある一方で、結果として生じる最終生成物が高塩負荷であることである。さらに、極めて反応しやすいカルボニルハロゲン化物を使用する際には、かなりの量の不要な副産物の生成を予想しなければならないことは、当業者に明白である。

【0010】

代替合成経路は、無水物によって進行する。したがって、たとえば、国際公開第 9 3 / 2 0 0 3 8 号パンフレット（Gist-Brocades, NL）は、フィトスフィンゴシンの N - アシル化用の反応性カルボン酸誘導体を得るために、カルボン酸とアルキルフェニルスルホニルクロリドから、混合無水物を塩基触媒合成することを教示している。

30

【0011】

これらの経路全部に共通しているのは、反応性カルボン酸誘導体の使用に依存していることである。これに関連した不都合は、こうした物質の高い腐蝕性およびそれらの健康に対する危険性の両者であり、これにより特別の反応器システムおよび注意が必要となり、したがって、調製の複雑さが増大する。加えて、本生成物を局所適用できるためには、反応しやすく有毒な前駆体および副産物が本生成物から除去されていることが保証されなければならない。高塩負荷、ならびにこれに関連した生成物精製および廃棄物処理のための付加的な複雑さもさらに予想される。先行技術の方法のさらなる不都合は、低い前駆体濃度および生成物濃度しか得られないことであり；たとえば、国際公開第 9 3 / 2 0 0 3 8 号パンフレット（Gist-Brocades, NL）は、反応性かつ有毒な共試薬である、塩化 p - トルエンスルホニルおよびトリエチルアミンの同時使用と共に、有毒な溶剤塩化メチレン中の最大 1 5 %（w / v）の前駆体溶液を記している。加えて、本生成物の純度または収量（いずれの場合にも、8 0 %）はいずれも満足のいくものではない。

40

【0012】

さらなる不都合は、単離された脂肪酸または脂肪酸誘導体に対する制限である。脂肪酸は、天然には主にグリセリド（脂肪および油）として生じ、それから脂肪酸を最初に得な

50

ければならない。特に、非常に敏感な脂肪酸、たとえば、多価不飽和脂肪酸等を用いるのであれば、これには、副反応を避けて脂肪酸を得るために、精巧な方法が必要である。今までのところ、天然のグリセリド、たとえば、オリーブ油、ひまわり油、アマニ油、菜種油、サフラワー油、大豆油、コーンオイル、ピーナッツ油、パーム油、パーム核油、ヤシ油、ヒマシ油、ゴマ油、アボカド油、豚脂、牛脂、ニンジン油、椿油、カカオバター、パンプキンシードオイル、アーモンドオイル、マンゴーバター、月見草油、ピスタチオオイル、ピーカンナッツオイル、米油、シーバックソーンオイル、マスタードオイル、黒クミンオイル、シアバター、くるみ油、キリ油、グレープシードオイル等、から出発するセラミドを調製する方法は皆無である。

【 0 0 1 3 】

したがって、本発明の目的は、無害かつ産業上利用することができる様式で、先行技術の不都合の少なくとも1つを克服することができる、セラミドを得る代替方法を提供することである。

【 0 0 1 4 】

生体触媒的に、すなわち、酵素を触媒として使用して、アミド化反応を得ることもできる。酵素の産業上の利用の概説は、たとえばLieseら (Industrial Biotransformations; Second, Completely Revised Edition, Wiley-VCH, Weinheim, 2006) に見られる。カルボン酸誘導体を合成するのに好ましい生体触媒は、加水分解酵素 (E.C. 3.1.x.x)、特にリパーゼ (トリアシルグリセロール加水分解酵素、E.C. 3.1.1.3) およびエステラーゼ (E.C. 3.1.1.1) である。

【 0 0 1 5 】

リパーゼは、細胞の代謝における自然機能に従って、エステルの加水開裂を優先的に触媒する。しかし、エステルの縮合的生成も、文献に多数記述されている。それらの代表例は、Drauz and Waldmann (Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, A Comprehensive Handbook; Second, Completely Revised and Enlarged Edition, Vol. II, Wiley-VCH, Weinheim, 2002)、Aehle (Enzymes in Industry, Production and Applications; Second, Completely Revised Edition, Wiley-VCH, Weinheim, 2004) またはBornscheuer (Enzymes in Lipid Modification, Wiley-VCH, Weinheim, 2000) に見られる。

【 0 0 1 6 】

リパーゼ - 触媒縮合反応における求核剤としてのアミンの使用例も、文献にある。

【 0 0 1 7 】

Y.-M. Xia et al., J Mol Catal B, 2004, 31,111-115は、たとえば、カンジダ・アンタークティカ (Candida antarctica (CALB)) 由来のリパーゼにより触媒される反応性一級アミンを用いたラウリン酸メチルのアミド化によるN - ラウロイル - アミノプロプリオニトリルの合成について記述している。記載の方法の不都合は、基質溶液の希釈 (50 mM未満) の制限に加え、僅か94.3%までの変換という、比較的低い変換である。さらに、示された反応には、位置選択性または化学選択性は全く必要ない。

【 0 0 1 8 】

しかし、前駆体分子、たとえば、フィトスフィンゴシン等は、複数の反応性官能基を有する可能性があるため、本発明による反応には、このような選択性が絶対的に必要であろう。この選択性の問題は、たとえばP.Tufvesson et al.: Biotechnol.Bioeng., 2007, 97 (3), 447-453により示され: エタノールアミンとカルボン酸とを用いたCALB - 触媒による反応において、酵素触媒によるエステル化を回避する単純な選択的アミド化は不可能であった。前駆体の多回添加および蒸留による反応水の除去によってのみ、所望のアミドの濃縮を達成することが可能であった。

【 0 0 1 9 】

酵素的アミド化のさらなる例で、M.Nechab et al.: JOC, 2007, 72, 6918-6923は、CALBを使用した、(R) 立体配置二級アミンの立体選択的反応について記述している。生成物の高い光学純度 (> 99% ee) が確認されたことから、CALBの(R) 立体配置アミンに対する強い優先傾向が示唆され、したがって、たとえばフィトスフィンゴシン

10

20

30

40

50

は、S - 立体配置であるため、この触媒で、アミン炭素原子に反応するかどうか疑わしい。加えて、やはり、非常に希釈された基質溶液 (100 mM) が、高濃度 (27% w (C A L B) / w (基質)) の生体触媒と同時に使用され、記載の方法の産業上の魅力を著しく制限している。

【0020】

国際公開第94/26919号パンフレット (Gist-Brocades, NL) は、細菌リパーゼまたは哺乳リパーゼの使用とともに、カルボキシルエステルを使用するフィトスフィンゴシンの酵素的N - アシル化について記述している。細菌リパーゼおよび哺乳リパーゼ、特に、シュードモナス・アルカリゲネス (*Pseudomonas alcaligenes*) 由来のリパーゼは、記載の方法で好ましく使用される。この方法の不都合は、特に、中程度の変換 (最高78%) を達成するだけのために、大量の生体触媒 (30 ~ 95% w / w) を必要とすることである。加えて、かなりの量の不要なN, O - ジアシル化生成物 (最高17%) が確認された。さらに、基質の希釈溶液のみが使用され (59 ~ 93 mM)、その結果として空時収量が低くなる。さらなる不都合は、基質としてフィトスフィンゴシン塩基に制限されることであり、フィトスフィンゴシンの酸付加生成物、たとえばフィトスフィンゴシンサルフェートの使用と比較して、基質価格の激増を伴う。さらに、酵母および真菌に由来するリパーゼは、触媒として不安定であることが明確に指摘されている。したがって、国際公開第94/26919号パンフレットに記述されている方法は、既存の化学的方法に代わる経済的に価値ある代替法としては除外される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

このように、先行技術の不都合を克服する、リゾスフィンゴ脂質を酵素的にアミド化する方法が引き続き必要である。

【0022】

したがって、本発明の目的は、先行技術の方法の不都合の1つまたは複数がない方法を提供することであった。特に、その意図は、容易に入手できる前駆体を、さらには高濃度で、使用することができる方法を開発することであった。

明確に言及されていないさらなる目的は、以下の説明、実施例および特許請求の範囲の文脈から明白である。

【課題を解決するための手段】

【0023】

本発明の目的は全く驚くべきことに、スフィンゴ脂質を調製するためのアシルドナーとして、多価アルコールの完全エステルまたは部分エステルを使用することにより達成される。

【0024】

この種のアシルドナー、たとえば脂肪および油としての、したがって、三価アルコールグリセロールのエステルのアシルドナーは、これまでに記載されていない。

【0025】

この主な理由は、たとえば、脂肪および油の使用に際して、反応中にかなりの量で、モノグリセリドおよびジグリセリドが蓄積することを、当業者が予想するであろうということである。このため、所望の反応は容易にできなくなるであろう；特に、予想される複雑で不明確な反応混合物は、純度が不満足な生成物をもたらし、それ故化粧品用途および/または皮膚用途におけるその使用を不可能にする。

【0026】

加えて、モノアシルグリセリドおよびジアシルグリセリドはかなりの界面活性剤特性を示し、反応混合物の完成 (working up) を紛れもなく困難にする。その上、この界面活性剤分子は、たとえば、生体触媒をその支持材から分離すること (浸出) により、酵素の活性および安定性をひどく害する可能性がある。このことは、所望の生体触媒的方法にとって二つの点で致命的であろう：第一に、浸出によって触媒が浪費されるであろう、すなわ

10

20

30

40

50

ち、新たな触媒の補給がより頻繁になり、したがって、当該方法の経済的魅力が減じられるであろうことを意味する。第二に、浸出によって生成物が酵素で汚染され、特に、酵素に対するアレルギー反応の危険性のため、化粧用製剤および/または皮膚用製剤におけるその使用が不可能になる。

【0027】

驚くべきことに、言及したモノグリセリドおよびジグリセリドは、本発明による方法の間のいかなる時点でも、顕著な量では検出されないことが分かった。油脂を使用した反応の完了後に検出可能な唯一の副産物はグリセロールであった。したがって、本発明による方法の1つの利点は、例として上述したモノグリセリドまたはジグリセリドの不都合を回避することある。

10

【0028】

本発明による方法のさらなる利点は、純粋な多価アルコール、たとえば、グリセロール等は、化粧品および皮膚科学で広く使用される溶剤に相当し、また生成物中に大量に残存できることである。代替法として、水を用いた抽出ステップによって、グリセロールを最終生成物から容易に除去することができる。

【0029】

本発明による方法のまたさらなる利点は、脂肪および油、特に天然の脂肪および油の使用により、容易に入手できる前駆体を本方法が利用することであり、したがって、容易に入手できない(部分的)合成メチルエステル、エチルエステルおよびプロピルエステルの使用と比較して、経済的観点から明白な利点を示す。

20

【0030】

本発明による方法は、比較的低い酵素濃度、たとえば使用する前駆体を基準にして10重量%未満を実施に必要とするため、および/または当該生体触媒を何度も、たとえば少なくとも10回、再使用できるため、経済的に価値のある方法でアミド化反応を実施できるという、さらなる利点を有する。したがって、本発明による方法のさらなる利点は、クロマトグラフィまたは分別結晶等の精巧な完成反応なしで、高純度、たとえば、有効含量>90%およびN,O-ジアシル化生成物の比率5%未満の生成物を調製することができることである。

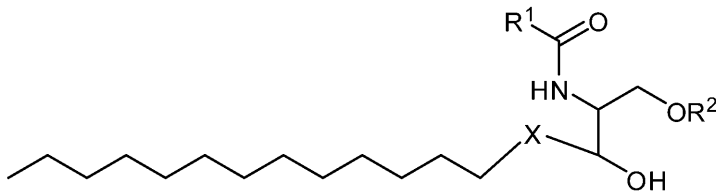
【発明を実施するための形態】

【0031】

本発明はしたがって、一般式I

30

【化4】

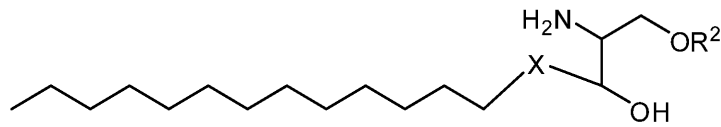


式 I

40

で示されるスフィンゴ脂質の生体触媒的調製方法であって、一般式 I I

【化5】

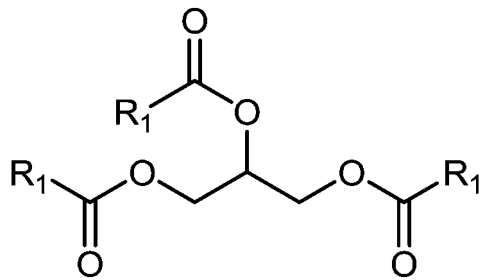


式 II

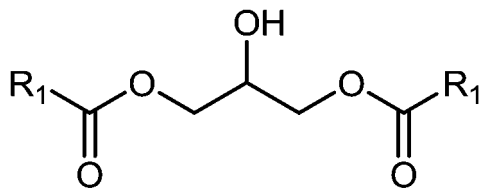
で表されるリゾスフィンゴ脂質と、

一般式 III a ~ e

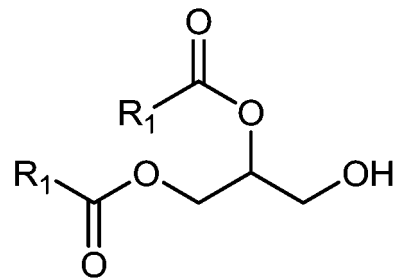
【化6】



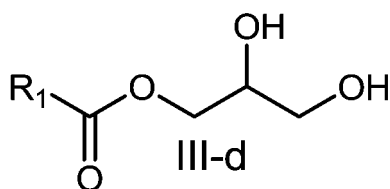
III-a



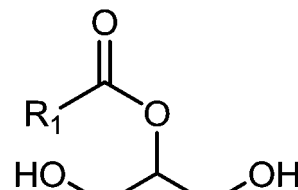
III-b



III-c



III-d



III-e

で表される化合物を含む群から選択される少なくとも1つのカルボキシルエステルを、
酵素クラス E.C.3.1.1 のカルボキシルエステル加水分解酵素を少なくとも1つ含む生

体触媒の存在下で反応させることによる、生体触媒の調製方法に関し、
式中、R¹ は、互いに独立してまた場合により異なってもよい、場合により1つもし
くは複数の多重結合および/または芳香環もしくは芳香族複素環を含んでもよく、場合
により酸素原子またはエステル官能基もしくはアミド官能基が割り込んでいてもよく、また
場合によりアルキル基、ヒドロキシ基、ケト基またはアミン基から選択される少なくと
も1つのさらなる基で置換されていてもよい、2~55個の炭素原子を有する直鎖または分
岐したアルキル鎖を表し、

R² は、H、ホスホコリン、エタノールアミン、セリンまたは糖を表し、

X は、CH=CH、CH₂-CH₂ または CH₂-HCOH を表す。

10

20

30

40

50

【0032】

この酵素クラスE.C.3.1.1のカルボキシルエステル加水分解酵素は、好ましくは菌界の生物から単離することができるもの、およびアミノ酸レベルで、菌界の生物から単離することができるものと少なくとも60%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、特に好ましくは少なくとも95%、98%または99%相同である、酵素クラスE.C.3.1.1のカルボキシルエステル加水分解酵素である。

【0033】

「アミノ酸レベルでの相同性」は、本発明の文脈で、以下、既知の方法を用いて決定することができる「アミノ酸同一性」を意味する。一般に、特定の要求を考慮に入れたアルゴリズムを用いた特別のコンピュータプログラムを使用する。同一性を決定する好ましい方法は、まず第一に比較すべき配列間の最大一致を生じさせる。同一性を決定するためのコンピュータプログラムとしては、

- GAP (Deveroy, J. et al., Nucleic Acid Research 12 (1984), page 387, Genetics Computer Group University of Wisconsin, Medicine (WI)、および

- BLASTP、BLASTNおよびFASTA (Altschul, S. et al., Journal of Molecular Biology 215 (1990), pages 403-410を含むGCGプログラムパッケージなどがあるが、この限りではない。このBLASTプログラムは、National Centre For Biotechnology Information (NCBI)およびさらなるソース (BLAST handbook, Altschul S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda ND 22894; Altschul S. et al., 上記) から入手できる。

【0034】

当業者は、2つのヌクレオチド間またはアミノ酸配列間の類似性または同一性を計算するために、様々なコンピュータプログラムを利用できることを承知している。したがって、2つのアミノ酸配列間のパーセンテージ同一性は、たとえばGCGソフトウェアパッケージ (<http://www.gcg.com>を介して得られる)のGAPプログラムに組み込まれている Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)) アルゴリズムによって、具体的には、 Blossom (62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか)、ギャップウェイト16、14、12、10、8、6、または4および長さウェイト1、2、3、4、5、または6を使用して、決定することができる。異なるパラメータの使用は、僅かに異なる結果につながるであろうが、2つのアミノ酸配列間のパーセンテージ同一性は、全体として著しく異ならないであろうことを、当業者は理解するであろう。通常は、プリセット (ギャップウェイト: 12、長さウェイト: 1) を適用し、 Blossom 62マトリックスが使用される。

【0035】

上述のアルゴリズムによる60%の同一性は、本発明との関連で、60%相同性を意味する。同じことが、より高い同一性にも当てはまる。

【0036】

本発明による方法におけるカルボキシルエステルは、特に好ましくは、グリセロールと少なくとも1つのカルボン酸とのエステルのうち、一般式I I I a ~ eで表される化合物を含む群から選択され、ここで、カルボン酸は、6 ~ 30個の炭素原子、特に8 ~ 22個の炭素原子を有する、天然の植物油または動物油をベースとする天然の脂肪酸の群から選択される。天然の脂肪酸は、分岐しておらず、また偶数の炭素原子から成る。どの二重結合も、シス立体配置である。例は: カプロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、イソステアリン酸、ステアリン酸、12-ヒドロキシステアリン酸、ジヒドロキシステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、ペトロセリン酸、エライジン酸、アラキニン酸、ベヘン酸、エルカ酸、ガドレイン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、アラキドン酸、9-または13-ヒドロキシオクタデカジエン酸、15-ヒドロキシエイコサテトラエン酸および一連のいわゆる - ヒドロキシ酸である。同様にこの関連で、そのカルボン酸は、特に好ましくは、ヒドロキシ-官能化酸の重縮合生成物 (たとえばポリ-12-ヒドロキシステアリン酸またはポリリシノール酸) である。

【0037】

本発明によれば、たとえばP. Lersch, U. Schick, Spec. Chem. Mag., 2003, 23(6), 30-31に記載の既報のフィトスフィンゴシンの場合に確立された発酵方法の結果として得られるもののような、リゾスフィンゴ脂質の酸付加生成物（酸付加塩ともよばれる）を使用することも可能である。好ましく使用されるリゾスフィンゴ脂質の酸付加生成物は、カルボン酸カルボキシレート、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、炭酸塩、水酸化物またはハロゲン化物、特に好ましくは、リゾスフィンゴ脂質の塩化物および硫酸塩である。

【0038】

本発明による方法でリゾスフィンゴ脂質の酸付加生成物を使用するとき、リゾスフィンゴ脂質は、酵素反応の前に、リゾスフィンゴ脂質の酸付加生成物の脱プロトン化によって調製されることが好ましい。

10

【0039】

こうして得られるリゾスフィンゴ脂質を、本明細書において以降、リゾスフィンゴ脂質塩基とも呼ぶ。

【0040】

脱プロトン処理は、従来の有機溶剤中、リゾスフィンゴ脂質の酸付加生成物の溶液または懸濁液で行うことができる。使用できる溶剤の例は：パラフィン、一価または多価アルコール（たとえば：メタノール、エタノール、イソプロパノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、シクロヘキサノール、メチルシクロヘキサノール、2-ブチル-1-オクタノールおよびそれらの異性体、エチレングリコール、グリセロール、ジアセトンアルコール、イソブタノール、等々）、エーテル（ジエチルエーテル、tert-ブチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ポリエトキシレート、ポリプロポキシレートおよびコポリマー等々）、ケトン（アセトン、メチルイソブチルケトン、メチルエチルケトン、等々）、エステル（クエン酸トリエチル、クエン酸トリブチル、イソ酪酸イソブチル、酢酸イソブチル、イソノナン酸イソノニル、酢酸2-エチルヘキシル、酢酸シクロヘキシル、酢酸4-tert-ブチルシクロヘキシル）である。メチルイソブチルケトンまたは2-メチル-2-ブタノール等の、毒物学的に許容できる溶剤が好ましい。

20

【0041】

脱プロトン化ステップは、溶剤が液体状態である反応温度で実施することができる。好ましくは、 $-80 \sim +150$ の間、特に好ましくは $0 \sim 120$ 、極めて特に好ましくは $+25 \sim 100$ の間の反応温度で実施される。

30

【0042】

このようにして得られるリゾスフィンゴ脂質塩基の溶液は、それ自身、酵素反応に使用することもでき、予め濾過することもできる。

【0043】

本発明のさらなる実施態様では、当業者によく知られている方法（たとえば蒸留、またはリゾスフィンゴ脂質塩基の沈殿/結晶化とその後の濾過による除去）で、脱プロトン化ステップの溶剤を除去することができる。このリゾスフィンゴ脂質塩基は場合により、たとえば沈殿または結晶化により、あるいは蒸留で溶剤を除去することにより、酵素反応の前に、単離してもよい。脱プロトン処理につながる塩が除去される濾過ステップは、リゾスフィンゴ脂質の酸付加生成物の脱プロトン化と生体触媒的調製との間に行われることが好ましい。

40

【0044】

代替法として、生体触媒作用中に、リゾスフィンゴ脂質の酸付加生成物の脱プロトン化によって、リゾスフィンゴ脂質塩基を調製することができる。

【0045】

活性化と関連した脱プロトン化は、塩基を使用することにより、好ましくは有機塩基または無機塩基を用いて、行うことができる。無機塩基として好ましく使用されるものは、水酸化物、炭酸塩、金属水素化物（たとえば：水素化リチウムアルミニウム、水素化カル

50

シウム、水素化ナトリウム等々)、イオン交換体(たとえば、陽イオン交換体または陰イオン交換体等)であり、有機塩基としては、金属オルガニル(たとえば、ブチルリチウム等)、アルコラート、アミドおよびそれらの金属塩、たとえば、リチウムジイソプロピルアミド等である。

【0046】

驚くべきことに、酵素反応で特に容易に反応させることができる特に高品質のリゾスフィンゴ脂質塩基は、特に、酸付加塩との反応で正式に水を少しも生成しない塩基によって提供されることが分かった。したがって、特に好ましい塩基は、その反応で、水を全く遊離しないものである。それらは、プロトン化後に水を少しも遊離しないものである。アルカリ金属アルコラートは、好ましくは塩基として使用される。これは、たとえばアルコール性溶液中に存在してもよい。ナトリウムメトキシドおよびカリウムメトキシドは特に好ましい。これらは同様に、有機溶剤中の溶液として使用することができる。

10

【0047】

反応水を回避するための、したがって同様に本発明による方法で好ましい、さらなる代替法は、アルカリ金属水酸化物および/またはアルカリ土金属水酸化物を塩基として使用する際に、その反応で生成される水を結合するために、水結合性の塩、好ましくは水結合性無機塩、たとえば、 Na_2SO_4 等を使用することである。好ましくは、 Na_2SO_4 が使用される。

【0048】

本発明によれば、本方法におけるリゾスフィンゴ脂質の酸付加生成物と塩基との間のモル比は、 $10:1 \sim 0.05:1$ 、好ましくは $3:1 \sim 0.2:1$ 、特に好ましくは $1.4:1 \sim 0.6:1$ の範囲内であり、極めて特に好ましくは、リゾスフィンゴ脂質の酸付加生成物と塩基との間のモル比は、等モルである。

20

本発明による方法の結果得られる部分グリセリドの含量は、前駆体としての一般式 I I I a ~ e のカルボキシルエステルの初期重量の質量を基準にして、好ましくは $2.5\% w/w$ 未満、特に好ましくは $1\% w/w$ 未満、極めて特に好ましくは $0.5\% w/w$ 未満である。

【0049】

本発明の特定の実施態様では、リゾスフィンゴ脂質塩基を調製するために、存在する任意の水が脱プロトン化混合物から除去される。このために使用される除水方法は、たとえば、物理的方法(たとえば蒸留、膜方法、抽出または吸着(たとえば分子篩))あるいは化学的方法(たとえば:金属水素化物および金属酸化物との反応、または、無水物、エステル等の他の反応物質との反応)等である。

30

【0050】

冒頭に既述の通り、国際公開第94/26919号パンフレット(Gist-Brocades)に記載の先行技術を考慮すると、真菌リパーゼを、本発明による方法で効率よい生体触媒として使用できることは、全く驚くべきことである。

【0051】

本発明による方法における生体触媒としては、とくに、菌界の生物から単離することができる酵素クラス E . C . 3 . 1 . 1 のカルボキシルエステル加水分解酵素、および/またはアミノ酸レベルで、菌界の生物から単離できるものと少なくとも 60% 、好ましくは少なくとも 80% 、より好ましくは少なくとも 90% 、特に好ましくは少なくとも 95% 、 98% または 99% 相同である、カルボキシルエステル加水分解酵素があり、その生物は、Aspergillus属、Bipolaris属、Candida属、Fusarium属、Geotrichum属、Humicola属、Microsporum属、Mucor属、Pichia属、Thermomyces属、Penicillium属、Rhizopus属、Rhizomucor属、Microsporum属、Mucor属、Nocardia属、Saccharomyces属、Streptomyces属、Trichosporon属、Zygosaccharomyces属の群から選択される。

40

【0052】

典型的な代表は、たとえば:
Aspergillus caesiellus、A. candidus、A. carbonarius、A. carneus、A. chevalieri、

50

本発明による方法で特に好ましく使用されるカルボキシルエステル加水分解酵素は、*Thermomyces lanuginosus* (受入番号 O 5 9 9 5 2) 由来のリパーゼ、*Candida antarctica* (受入番号 P 4 1 3 6 5) 由来のリパーゼ A および B ならびに *Mucor miehei* (受入番号 P 1 9 5 1 5) 由来のリパーゼ、*Humicola sp.* (受入番号 O 5 9 9 5 2) 由来のリパーゼ、*Rhizomucor javanicus* (受入番号 S 3 2 4 9 2) 由来のリパーゼ、*Rhizopus oryzae* (受入番号 P 6 1 8 7 2) 由来のリパーゼ、*Candida rugosa* (受入番号 P 2 0 2 6 1、P 3 2 9 4 6、P 3 2 9 4 7、P 3 2 9 4 および P 3 2 9 4 9) 由来のリパーゼ、*Rhizopus niveus* (受入番号 P 6 1 8 7 1) 由来のリパーゼ、*Penicillium camemberti* (受入番号 P 2 5 2 3 4) 由来のリパーゼ、*Aspergillus niger* (A B G 7 3 6 1 3、A B G 7 3 6 1 4 および A B G 3 7 9 0 6) 由来のリパーゼおよび *Penicillium cyclopium* (受入番号 P 6 1 8 6 9) 由来のリパーゼの群から選択される酵素、ならびに、各場合において、アミノ酸レベルで、少なくとも 60%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 90%、特に好ましくは少なくとも 95%、98% または 99% 相同のものである。相同性に関しては、前述の定義を参照することが可能である。

【0054】

市販例および同様に本発明による方法で好ましく使用されるカルボキシルエステル加水分解酵素は、商品 Lipozyme TL IM、Novozym 435、Lipozyme IM 20、Lipase SP382、Lipase SP525、Lipase SP523、(全て Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark の商品)、Chirazyme L2、Chirazyme L5、Chirazyme L8、Chirazyme L9 (全て Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany の商品)、および Lipase M “Amano”、Lipase F-AP 15 “Amano”、Lipase AY “Amano”、Lipase N “Amano”、Lipase R “Amano”、Lipase A “Amano”、Lipase D “Amano”、Lipase G “Amano” (全て Amano, Japan の商品) である。

【0055】

本生体触媒は、無水物または部分的水和物の形で好ましく使用される。本生体触媒は、固定化されるかまたは凍結乾燥物として使用することができる。固定化のために使用することができる担体は、不活性な有機担体または無機担体である。固定化型酵素に好ましく使用されるかまたは存在する不活性な担体は、粒子の少なくとも 90% が 10 ~ 5000 μm 、好ましくは 50 ~ 2000 μm の粒径を有する粒径分布を有する粒状担体である。特に使用することができる有機担体は、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリビニルスチレン、スチレン-ジビニルベンゼンコポリマー、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、PTFE および / または他のポリマーを含むか、またはこれらから成るものである。固定化すべき酵素に応じて、特に酸性イオン交換樹脂または塩基性イオン交換樹脂、たとえば Duolite A568、Duolite XAD 761、Duolite XAD 1180、Duolite XAD 7HP、Amberlite IR 120、Amberlite IR 400、Amberlite CG 50、Amberlyst 15 (全て Rohm and Haas の製品) または Lewatit CNP 105 および Lewatit VP OC 1600 (Lanxess, Leverkusen, Germany の製品) を、担体材料として使用することができる。使用することができる無機担体は、最新技術で周知の酸化物 (oxidic) 担体および / またはセラミック担体である。特に使用できる無機担体は、たとえばセライト、沸石、シリカ、細孔制御ガラス (CPG) またはたとえば、L. Cao, “Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design”, Wiley-VCH: 2005, Weinheim, Germany に記載されているもののような他の担体である。固定化型酵素に存在する不活性な担体または固定化型酵素の製造に使用される不活性な担体は、特に好ましくはポリビニルスチレン、ポリメタクリレートまたはポリアクリレートから成る。

【0056】

本発明によれば、共有結合的または非共有結合的に、好ましくは非共有結合的に、粒子上に固定化することが可能である。非共有結合的固定化の場合、たとえば酵素水溶液 (たとえば無機塩または洗浄剤等のさらなる成分を含んでもよい) を用いて、担体をインキュベートするかまたは含浸させる。このインキュベーション / 含浸は、たとえば 0 ~ 50、好ましくは 0 ~ 40 の温度で、実施することができる。このインキュベーション / 含浸は、数分から数時間までの期間にわたって好ましく行われる。インキュベーション

の進行は、従来の蛋白質測定方法で溶液中の酵素濃度を測定することにより追跡することができる。所望の程度の固定化に到達した後、好ましくは担体を水洗し、必要に応じて乾燥させる。

【0057】

好適な生体触媒を含む全細胞を、静止細胞としてまたは乾燥型としてのいずれかで、好ましくは先行技術の方法で透過処理して、使用することも可能である。

【0058】

本発明によれば、使用される基質に対して、0.01～300% (w/w) の量比で、生体触媒を使用することができる。それぞれの反応条件で(特に、基質、それらの濃度、溶剤および反応温度に応じて)、好ましい質量比は、生体触媒の比活性から得られる。こうしたパラメータに応じて、生体触媒の好ましい量は、1～96時間、好ましくは8～24時間の期間内に、反応物質の完全変換を可能にする量である。生体触媒の量は、前駆体の全質量を基準にして、1～100% (w/w) および極めて特に好ましくは1～50% (w/w)、特に1～20% (w/w) の範囲で、好ましく使用される。

【0059】

ある特定の実施態様では、この生体触媒は回収される(recovered)。

【0060】

本発明によれば、酵素反応の開始時に、反応物質は、1:10～10:1というリゾスフィンゴ脂質とカルボキシルエステルとのモル比で存在することが可能である。この関連で、用語「モル比」は、リゾスフィンゴ脂質アミンとアシルドナーカルボキシレート基とのモル比に関する。1:3～3:1の量比が、好ましく使用される。1:1.4～1.4:1の量比、とりわけ等モル量比が、特に好ましく使用される。

【0061】

反応物質は、さらなる溶解剤を含まずに熔融状態で存在してもよく、有機溶剤中に溶解または懸濁されていてもよい。反応は、好ましくは有機溶剤中で実施される。特に適した溶剤は、20～130の範囲内の温度で、反応物質を高濃度で溶解することができるものである。特に適していると証明されている例は、たとえば、メチルイソブチルケトンまたはシクロヘキサノン等のケトン、2-ブチル-1-オクタノール、メチルシクロヘキサノール、1-メトキシ-2-プロパノール、2,3-ブタンジオール2-オクタノール、ジアセトンアルコール、2-メチル-2-ブタノール等の立体障害性二級アルコール、酢酸4-tert-ブチルシクロヘキシル、酢酸2-エチルヘキシル、酢酸シクロヘキシル等の立体障害性エステルならびに1,4-ジオキサソ、テトラヒドロフランおよびVaronic APM (Evonik Goldschmidt GmbH, Essen, Germany) 等のエーテルであるが、こうした溶剤に限定されない。不適当であると証明されている溶剤は、とりわけ生体触媒によるかなり大きい活性で変換されるエステルである。フィトスフィンゴシンを前駆体として用いて、酪酸エチルを使用した反応で、たとえば所望の生成物に加えて、かなりの量の、N-ブチリルフィトスフィンゴシンと使用したアシルドナー(たとえばステアリン酸メチル)とのエステル交換生成物を検出することができた。同じことが、酢酸ブチルの使用にも当てはまる(N-アセチルフィトスフィンゴシンとアシルドナーブチルエステルの形成)。

【0062】

本反応は、カールフィッシャー(Karl Fischer)法で検出される含水量が0.100M以下、0.010M以下および特に好ましくは最高でも0.005Mとして定義された無水条件で好ましく実施される。

【0063】

高基質濃度は、反応速度に特に有利である。変換率が高いと、生成物が高濃度になるが、驚くべきことに、変換率が高いとき、酵素活性に対して悪影響はない。酵素反応では生成物阻害が通常観察されるため、このことは当業者には驚くべきことである。加えて、驚くべきことに、非常に高い変換乃至定量的変換を達成するために、反応生成物(セラミドまたはアルコール)の1つを反応混合物から除去することが、絶対的に必要というわけではないことが分かった。当業者によく知られているLe Chatelierの原理に従えば、このこ

10

20

30

40

50

とが本平衡反応に関して予想されたであろう。僅か67～78%という先行技術(国際公開第94/26919号パンフレット、Gist-Brocades)の反応率が、その必要を予想させることになった。しかし、本発明によれば、より低い基質濃度でも、効率よく反応することが可能である。

【0064】

本発明の文脈で好ましい反応開始時の反応物質濃度は、各反応物質について、0.01 M～3 Mの範囲内、特に0.2 M～2 Mの範囲内、特に好ましくは0.5 M～1.0 Mの範囲内である。

【0065】

反応温度に関して、特に適した温度は、基質が溶剤に均質に溶解する温度であることは分かっていた。これに関連して、20～130の範囲内の反応温度が有利であった。とりわけ高温では、変色のため、反応混合物の注意深い脱気が必要である。しかし、驚くべきことに100以下の反応温度では、この種の用心は無用であることが分かった。したがって、反応温度は、好ましくは40～90の範囲内であり、極めて特に好ましくは、70～85の範囲内である。

【0066】

反応は好ましくは、1 bar未満、好ましくは0.5 bar未満、特に好ましくは0.05 bar未満の圧力で実施される。

【0067】

この反応は、バッチ方法(攪拌容器)で実施することもでき、または固定床反応器で連続的または半連続的に実施することもできる。高速の生体触媒失活は、とりわけバッチ方法で推定されるものであった。攪拌によって生じる機械的ストレスによる生体触媒の機械的破壊、ならびに反応物質および溶剤に起因する失活作用と対をなす生体触媒の熱失活について留意すべきである。このような作用は当業者に周知であり、また好適な救済策が文献に開示されている。したがって、たとえば生体触媒の機械的疲弊が攪拌方法で起きるのであれば、固定床を使用することにより、これを回避することが可能である。さらなる反応器は、当業者に周知であり、同様に、機械的酵素失活を回避するのに好適である。

【0068】

さらに、エステルをアシルドナーとして使用するとき、遊離したアルコールによって生体触媒が化学的に失活されることが予想される(たとえば:Y. Yoshida et al., J. Biosci. Bioeng., 2006, 102(1), 66-68)。このような失活を回避する方法は当業者に周知であり、たとえば、蒸留による反応混合物からのアルコール除去や膜方法の使用などがある。しかし、驚くべきことに、上述の方法を使用しなくても、活性を著しく損失せずに生体触媒を何度も再使用できることが分かった。

【0069】

特に、天然のグリセリドを使用するとき、ジグリセリドおよびモノグリセリドは、少なくとも中間体として反応混合物中に蓄積し、変換が不完全であれば、生成物がかなり汚染されることになるであろうことが予想された。さらに、上述の部分グリセリドは界面活性剤特性を有するため、生体触媒がかなり失活する可能性があることが予想された。しかし、驚くべきことに、予想される部分グリセリドが、実質的に検出されないことが分かった。反応の経過中に、ガスクリマトグラフィ分析で、最大でも微量(<1% w/w)を検出することが可能であった。

【0070】

結果として得られる生成物が、スフィンゴ脂質および高比率(全生成物の最高19%)の対応するN,O-ジアシル化生成物の組成物であることは、先行技術に記載されている全ての方法に共通である。こうした組成物は、たとえば、N,O-ジアシル化生成物の比率が5%以上であるため、化粧品組成物に全く使用できない。さらに、本発明による方法では、驚くべきことに、二級アミン官能基のアミド化は、アルコール官能基の1つのエステル化より紛れもなく好ましいことが分かった。反対の挙動、特に、一級、すなわち立体的に容易に近づける、アルコール官能基の選好が予想されたであろう。先行技術(国際公

10

20

30

40

50

開第94/26919号パンフレット、Gist - Brocades) は、類似した状況について記している：細菌リパーゼを使用し、アシルドナーがフィトスフィンゴシンより60%モル過剰であっても、その状況で得られた反応生成物は、かなりの比率のN, O - ジアシル化生成物(モノジアシル化生成物とジアシル化生成物の比率 > 1 : 5)を含んでいた。

【0071】

それとは反対に、リゾスフィンゴ脂質より3.6倍過剰のアシルドナーを用いても、リゾスフィンゴ脂質が反応混合物中に存在する限り、顕著なジアシル化がないことを、本発明による方法で示すことが可能であった。リゾスフィンゴ脂質が完全にスフィンゴ脂質に変換されていたときに限って、緩徐なエステル化活性を検出することが可能である。リゾスフィンゴ脂質およびアシルドナーを化学量論的に使用したとき、上述の不要な副反応はほとんど認められなかった。

10

【0072】

したがって本発明は、酵素反応による粗生成物としてでさえ、特に純粋なN - アシルフィトスフィンゴシンが得られる方法に関する。式Iで表される標的化合物に関連した変換は、理論的に予想される変換の好ましくは80%超、特に好ましくは85%超、および極めて特に好ましくは90%超である。

【0073】

本発明による方法はさらに、式Iおよび0.001 ~ 19質量%、好ましくは0.005 ~ 19質量%、特に好ましくは0.01 ~ 5質量%の、対応するN, O - ジアシル化生成物を含む組成物を調製するのに好適である。

20

【0074】

したがって、本発明は同様に、本発明による方法を使用して調製される、式Iおよび0.001 ~ 19質量%、好ましくは0.005 ~ 19質量%、特に好ましくは0.01 ~ 5質量%の、対応するN, O - ジアシル化生成物を含む組成物に関する。

【0075】

本発明は同様に、本発明による方法を使用して調製されるスフィンゴ脂質に関する。

【0076】

本発明はさらに、スフィンゴ脂質を反応混合物から分離する方法に関する。スフィンゴ脂質は好都合な物理的性質を有するため、スフィンゴ脂質は結晶化/沈殿により反応溶液から容易に除去することができ、したがって、既に高い粗生成物の純度を、簡単な方法でさらに高めることができる。

30

【0077】

スフィンゴ脂質および本発明による組成物は、化粧品用製剤および医薬製剤の製造に特に適する。したがって本発明は同様に、本発明による少なくとも1つのスフィンゴ脂質および/または本発明による1つの組成物を含む、化粧品用製剤または医薬製剤に関する。

【0078】

本発明を、以下に詳述する実施例において例として説明するが、本発明は、実施例で言及されている実施態様に限定されることは意図されず、その適用範囲は完全な記述および特許請求の範囲から明白である。

【実施例】

40

【0079】

実施例1：アシルドナーとしてのトリステアリン

トリステアリン酸グリセロール(トリステアリン)をアシルドナーとして使用して、酵素反応を実施した。80℃で、ジオキサン17g中にフィトスフィンゴシン5.4gおよびトリステアリン5gを含む溶液に、Novozym 435 0.5gを加え、大気圧下で撹拌した。試料を定期的に採取し、ガスクロマトグラフィで分析した。

【0080】

この実験は、定性的に同じ反応経過を示すさらなるグリセリドの使用の代表であり、とりわけ、中間体部分グリセリドは検出不能であることが観察される。

【0081】

50

図 1 から明らかなように、アシルドナーの完全変換は可能である。驚くべきことに、中間体部分グリセリド（ジステアリン酸グリセロールまたはモノステアリン酸グリセロール）はほとんど確認されないことが、ガスクロマトグラフィによる分析から明らかになった。

【 0 0 8 2 】

実施例 2：フィトスフィンゴシンと天然油との酵素反応

いずれの場合にも、2 - メチル - 2 - ブタノール 8.5 g に、フィトスフィンゴシン 5 g を溶解し、1 当量（等モル比のフィトスフィンゴシンとカルボキシレート量）の天然油を加える。油の初期比重は、その油の鹸化価から導かれる；それから算出されるカルボキシレートの量は、バッチ数量を計算するのに役立つ。いずれの場合にも、Novozym 435 0.75 g を加えた後、その反応混合物を 80 °C、N₂ 雰囲気中で、24 時間攪拌する。次いで、この反応混合物を熱濾過し、溶剤を真空除去する。結果として生じる生成物をガスクロマトグラフィで分析する；加えて、ヨウ素価および（ハーゼン）色数を測定する。いずれの生成物でも、> 1 % w/w の部分グリセリド類は検出されなかった。

【 0 0 8 3 】

【表 1】

油	変換 [%] ^a	色数 ^b	ヨウ素価 ^c	過酸化物価 ^d
アマニ油 ^e	98.7	21.1	95	4
アマニ油 ^f	99.2	6.9	96	2
アマニ油 ^g	96.6	12.7	96	5
オリーブ油	98.1	8.2	41	4
菜種油	99.1	5.3	52	2
ひまわり油	99.3	4.6	63	2
魚油（メンハーデン）	99.8	6.3	74	6
魚油（肝油）	99.4	6.0	67	4

a: ガスクロマトグラフィでの分析によるフィトスフィンゴシンに基づく

b: 2-Me-2-ブタノール中1M溶液としての、Hess-Ives色数

c: 2-Me-2-ブタノール中1M溶液としての、Wijsヨウ素価

d: mEq O₂/kgで表した過酸化物価

e: 標準大気下での反応

f: 窒素雰囲気での反応

g: 50°C、標準大気下での反応

【 0 0 8 4 】

実施例 3：スフィンゴシンの使用

スフィンゴシン 3 g を、2 - メチル - 2 - ブタノール 5 g に溶解し、1 当量のアマニ油（鹸化価により決定されるカルボキシレートの量）を加える。Novozym 435 0.5 g を加えた後、この反応混合物を、80 °C、窒素雰囲気中で 24 時間攪拌する。次いでこの混合物を熱濾過し、溶剤を減圧除去する。このようにして得られた生成物を、ガスクロマトグラフィで分析する。検出可能な微量のモノグリセリドまたはジグリセリドを含まない 98. 50

0%という変換が達成される。

【0085】

実施例4：スフィンガニンの使用

スフィンガニン3gを2-メチル-2-ブタノール5gに溶解し、1当量のアマニ油（鹸化価により決定されるカルボキシレートの量）を加える。Novozym 435 0.5gを加えた後、この反応混合物を、80℃、窒素雰囲気中で24時間攪拌する。次いでこの混合物を熱濾過し、溶剤を減圧除去する。このようにして得られた生成物を、ガスクロマトグラフィで分析する。変換は99.7%であり、検出可能な微量のモノグリセリドおよびジグリセリドを含まない。

フロントページの続き

- (74)代理人 100134120
弁理士 内藤 和彦
- (72)発明者 ホールマン, フランク
オランダ国, デン ハーグ エヌエル - 2 5 2 2 ジェイジェイ, ヤン テン プリンクストラ
ト 1 4 1
- (72)発明者 トゥム, オリバー
ドイツ国, ラティンゲン 4 0 8 8 0, メイグナー ブッシュ 1 4
- (72)発明者 グルゼビク, パウエル
ドイツ国, オーバーハウゼン 4 6 1 4 7, アン デル シュレンケ 2 8
- (72)発明者 トレ, クリストフ
ドイツ国, デュイスブルク 4 7 1 6 7, エベルハルトストラッセ 3 8

審査官 松浦 安紀子

- (56)参考文献 特表2006-526400(JP, A)
特表平07-508889(JP, A)
Tetrahedron Lett., 2005, Vol.46, p.3291-3295

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12P 13/02
C12P 7/62
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)