(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Dezember 2003 (18.12.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/104472 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: C12P 7/64

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/05598

(22) Internationales Anmeldedatum:
28. Mai 2003 (28.05.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 25 117.7 6. Juni 2002 (06.06.2002) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **COGNIS DEUTSCHLAND GMBH & CO. KG.** [DE/DE]; Henkelstrasse 67, 40589 Düsseldorf (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **ZANDER, Lars** [DE/DE]; Cäcilienstrasse 12, 40597 Düsseldorf (DE). **BUSCH, Stefan** [DE/DE]; Lohstrasse 42, 46047 Oberhausen (DE). **MEYER, Carolin** [DE/DE]; Am Trippelsberg 210, 40589 Düsseldorf (DE). **BOTH, Sabine** [DE/DE]; Neustädter Weg 23, 40229 Düsseldorf (DE). **SCHÖRKEN, Ulrich** [DE/DE]; Pascalstr. 16, 40591 Düsseldorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(national)*: CA, JP, NO, US.

(84) Bestimmungsstaaten *(regional)*: europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

Erklärung gemäß Regel 4.17:
— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*
— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 03/104472 A1

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING CONJUGATED LINOLEIC ACID

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON KONJUGIERTER LINOLSÄURE

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for producing conjugated linoleic acid whereby (a) conjugated linoleic acid low alkyl esters are hydrolysed with water in the presence of enzymes, while the alcohol is continuously removed, (b) the hydrolysate is separated into an organic phase and an aqueous/alcoholic phase, and (c) the organic phase containing the conjugated linoleic acid is liberated from non-reacted conjugated linoleic acid low alkyl esters.

(57) **Zusammenfassung:** Vorgeschlagen wird ein Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure, bei dem man (a) konjugierte Linolsäureniedrigalkylester in Gegenwart von Enzymen mit Wasser unter kontinuierlicher Alkoholentfernung hydrolysiert, (b) das Hydrolysat in eine organische und eine wässrig/alkoholische Phase auftrennt, und (c) die die konjugierte Linolsäure enthaltende organische Phase von nicht-umgesetzten konjugierten Linolsäureniedrigalkylestern befreit.

Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung befindet sich auf dem Gebiet der Fettsäuren und betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure durch enzymatische Hydrolyse ihrer Ester.

Stand der Technik

Linolsäuren mit konjugierten Doppelbindungen, die unter der Bezeichnung "CLA" (conjugated linoleic acid) im Handel sind, sind physiologisch aktiv und werden als Lebensmittelzusatzstoffe eingesetzt. Üblicherweise geht man zur Herstellung von konjugierter Linolsäure von Triglyceriden aus, die über einen hohen Anteil an - üblicherweise nichtkonjugierter - Linolsäure verfügen, wie beispielsweise Distel- oder Sonnenblumenöl. Die Triglyceride werden in Gegenwart von basischen Katalysatoren oder Enzymen isomerisiert und dann verseift. Von Nachteil dabei ist, dass die Verseifung zum einen eine Menge unerwünschter Abfallstoffe liefert und zudem hohe Mengen an Alkalien erforderlich sind, was rasch zu Korrosion in den Reaktoren führen kann. Um dies zu vermeiden, geht man in neuerer Zeit vorzugsweise von den Linolsäurealkylestern aus, die zunächst zu den CLA-Estern isomerisiert und dann verseift werden. Doch auch dieses Verfahren kann nicht völlig überzeugen, da es ebenfalls mit Nachteile behaftet ist, wie z.B. geringe Ausbeuten, drastische Reaktionsbedingungen, unerwünschte Nebenprodukte und lange Reaktionszeiten.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung hat folglich darin bestanden, ein Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure zur Verfügung zu stellen, das die genannten Nachteile des Stands der Technik zuverlässig vermeidet.

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure, bei dem man

(a) konjugierte Linolsäureniedrigalkylester in Gegenwart von Enzymen mit Wasser unter kontinuierlicher Alkoholentfernung hydrolysiert,
(b) das Hydrolysat in eine organische und eine wässrig/alkoholische Phase auftrennt, und
(c) die die konjugierte Linolsäure enthaltende organische Phase von nicht-umgesetzten konjugierten Linolsäureniedrigalkylestern befreit.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass eine enzymatische Hydrolyse unter kontinuierlicher Alkoholabtrennung zu Fettsäuren führt, die frei von unerwünschten Nebenprodukten sind. Es werden hohe Ausbeuten erzielt, das Verfahren arbeitet bei milden Bedingungen und mit Katalysatoren, die alle Anforderungen an die Umweltverträglichkeit erfüllen. Erfolgt während des Hydrolyseverfahrens die Alkoholentfernung kontinuierlich direkt aus dem Hydrolysereaktor, erreicht man in einem Einstufenverfahren zudem eine weitaus schnellere Umsetzung.

Konjugierte Linolsäureniedrigalkylester

Als Ausgangsstoffe für das erfindungsgemäße Verfahren dienen Linolsäureniedrigalkylester, die vorzugsweise der Formel (I) folgen,

$$R^1CO\text{-}OR^2 \qquad (I)$$

in der R^1CO für den Acylrest einer Linolsäure mit konjugierten Doppelbindungen und R^2 für einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen steht. Insbesondere werden konjugierte Linolsäuremethyl- und/oder -ethylester eingesetzt.

Enzyme

Typische Beispiele für geeignete Enzyme, die jedoch nicht einschränkend sein sollen, sind Lipasen und/oder Esterasen von Mikroorganismen die ausgewählt sind aus der Gruppe, die gebildet wird von *Alcaligenes sp., Aspergillus niger, Candida antarctica A, Candida antarctica B, Candida cylindracea, Chromobacterium viscosum, Rhizomucor miehei, Penicilium camenberti, Penicilium roqueforti, Porcine pancreas, Pseudomonas cepacia, Pseudomonas fluorescens, Rhizopus javanicus, Rhizopus oryzae, Thermomyces lanugenosus* sowie deren Gemischen. Bevorzugt, weil besonders aktiv, sind Lipasen und Esterasen aus den Organismen *Alcaligenes, Candida, Chromobacterium, Rhizomucor, Pseudomonas, Rhizopus und Thermomyces*. Die Enzyme werden in der Regel als verdünnte Suspensionen oder wässrige Konzentrate eingesetzt. Die Lipasen/Esterasen können auch immobilisiert auf Trägermaterial eingesetzt und in sogenannten "repeated batches" wiederverwendet werden.

Hydrolyse

Die Hydrolyse der Fettsäurealkylester erfolgt vorzugsweise bei milden Temperaturen im Bereich von 20 bis 80 °C, vorzugsweise 30 bis 70 °C und besonders bevorzugt 35 bis 60 °C unter kontinuierlicher Abtrennung des niederen Alkohols, also üblicherweise von Methanol bzw. Ethanol unter vermindertem Druck, wobei die bevorzugte Temperatur durch das Aktivitätsoptimum der eingesetzten Enzyme vorgegeben wird.

A) Als Hydrolyseverfahren eignet sich eine diskontinuierliche Fahrweise („Batch"), bei der ein konstanter Wassergehalt üblicherweise im Bereich von 30 – 70 Gew.-% im Reaktor über Nachdosierung von Wasser eingestellt wird. Üblicherweise wird die Reaktion bei einer Temperatur von 30 bis 50 °C und einem verminderten Druck von 20 - 60 ± 5 mbar durchgeführt. Bei dieser Fahrweise wird kontinuierlich ein Alkohol/Wasser-Gemisch entfernt („gestrippt").

B) Als weiteres eignet sich ein Hydrolyseverfahren in ebenfalls diskontinuierlicher Fahrweise, bei der Wasser kontinuierlich eingespeist wird und dauerhaft ein Alkohol/Wasser-Gemisch entfernt („gestrippt") wird. Üblicherweise ist der Wassergehalt im Reaktor bei dieser Fahrweise gering (0 bis 20 Gew.-%). Die Reaktion wird üblicherweise bei einer Temperatur von 50 bis 70 °C und einem verminderten Druck von 20 - 60 ± 5 mbar durchgeführt.

C) Alternativ eignet sich auch eine mehrstufige Hydrolyse ohne kontinuierliche Entfernung der Alkoholkomponente. Nach erfolgter enzymatischer Hydrolyse wird die Wasserphase, die auch große Teile des wasserlöslichen kurzkettigen Alkohols enthält, von der organischen Phase getrennt und eine frische Wasserphase wird zugegeben. Die Wasserphase wird typischerweise 1 – 3 mal gewechselt. Die Reaktion wird üblicherweise bei einer Temperatur von 20 bis 70 °C durchgeführt und einem Wassergehalt von 50 – 75 % durchgeführt. Die Hydrolyse kann mit immobilisiertem Enzym, dass in jeder Hydrolysestufe erneut eingesetzt werden kann, sowie mit nicht immobiliseirtem Enzym durchgeführt werden. In jeder Hydrolysestufe muss dann frisches Enzym zugegeben werden.

Aufarbeitung

Im Anschluss an die Hydrolyse wird die wässrig/alkoholische von der organischen Phase getrennt und letztere aufgearbeitet, d.h. nicht umgesetzter Alkylester vom Wertprodukt entfernt. Je nach Dauer der Hydrolyse werden unterschiedliche Spaltraten erhalten. Die Reaktion kann früh, beispielsweise schon im Bereich einer Umsetzung von 60 Gew. %, abgebrochen werden, so dass die nachfolgende Trennung von Fettsäuren und Fettsäureestern erfolgen muss. Sie kann jedoch auch erst bei über 90 Gew.-%, vorzugsweise über 95 Gew.-% beendet werden, oder sogar bis zu > 99 Gew.-% weitergeführt werden, so dass keine anschließende Abtrennung mehr notwendig ist. Die Trennung kann destillativ oder über Verseifung der freien Fettsäure und anschließender Phasenseparation erfolgen. Insbesondere ist aber eine komplette Hydrolyse der konjugierten Linolsäureester (Spaltgrad > 99 %) unter milden Reaktionsbedingungen bevorzugt, um eine Veränderung der Isomerenzusammensetzung zu vermeiden.

Beispiele

Beispiel 1

Selektion geeigneter Lipasen.

15 Ansätze mit jeweils 4 g konjugiertem Linolsäureethylester und 6 g Wasser in einem verschließbaren Reaktionsgefäß wurden bei Raumtemperatur parallel auf einer Multirührplatte gerührt. Zu den Ansätzen werden jeweils 40 mg kommerziell erhältliche Lipasen bzw. Esterasen zudosiert. Nach 2 h und 22 h Reaktionszeit werden jeweils Proben genommen. Die organische Phase enthaltend Fettsäureethylester und enzymatisch hydrolysierte Fettsäure wurden separiert und analysiert. Der Umsatz wurde über die Säurezahl bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1
Eingesetzte Lipasen und Esterasen

Enzym	Mikroorganismus	Hersteller	Säurezahl		Umsatz	
			2h	22h	2 h	22 h
Chirazym L-10	*Alcaligenes sp.*	Roche	21	41	11,5	20,5
Lipase A	*Aspergillus niger*	Amano	6	16	3	8
Novozym 868	*Candida antarctica A*	Novozymes	5	6	2,5	3
Novozym 525	*Candida antarctica B*	Novozymes	52	62	26	30
Lipomod 34	*Candida cylindracea*	Biocatalysts	45	61	22,5	30
Lipase LP	*Chromobacterium viscosum*	Asahi Kasei	45	60	22,5	30
Novozym 388	*Rhizomucor miehei*	Novozymes	8	11	4	5,5
Lipase G	*Penicilium camenberti*	Amano	15	38	7,5	19
Lipase R	*Penicilium roqueforti*	Amano	6	6	3	3
Lipase L115P	*Porcine pancreas*	Biocatalysts	6	6	3	3
Lipase PS	*Pseudomonas cepacia*	Amano	46	57	23	28,5
Lipase AK	*Pseudomonas fluorescens*	Amano	26	53	13	26,5
Lipomod 36 P	*Rhizopus javanicus*	Biocatalysts	21	38	11,5	19
Lipase F-AP 15	*Rhizopus oryzae*	Amano	12	18	6	9
Lipolase Tl 100	*Thermomyces lanugenosus*	Novozymes	38	53	19	26,5

Alle getesteten Lipasen und Esterasen erwiesen sich in der Hydrolyse der Fettsäureester aktiv. Bevorzugt sind jedoch Mikroorganismen vom Typ Alcaligenes, Candida, Chromobacterium, Penicilium, Pseudomonas, Rhizopus und Thermomyces. Die Reaktion ohne Entfernung von Ethanol reagierte unter obigen Bedingungen bis zu einem Gleichgewicht von etwa 30 Gew.-% freier Fettsäure.

Beispiel 2

Hydrolyse von kurzkettigen konjugierten Linolsäuremethylestern unter kontinuierlichem Abstrippen von Wasser und Methanol.

Hydrolyseversuch nach Verfahren A)

In einen beheizbaren Kolben wurden 400 g konjugierter Linolsäuremethylester, 200 g Wasser und 20 g auf Polypropylen immobilisierte *Candida antarctica* B Lipase vorgelegt. Die Reaktion wurde mit aufgesetzter Destillationsbrücke bei einem verminderten Druck von 60 mbar und einer Temperatur von 60 °C durchgeführt. Wasser wurde kontinuierlich mit einer Flussrate von 0,5 ml/min in den Kolben gepumpt und im Kolben wird ein Wassergehalt von 30 – 40 % eingestellt. Die Umsetzung der Reaktion wurde über Bestimmung der Säurezahl verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch vom immobilisierten Enzym abfiltriert und die organische Phase von der wässrigen Phase über Separation getrennt. Eine Säurezahl von 200 entsprach 100 % Umsatz. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst:

Tabelle 2
Umsatz unter Abstrippen von Wasser und Methanol nach unterschiedlichen Reaktionszeiten

Reaktionszeit [h]	Säurezahl	Umsatz [%]
0	0	0
2	96,4	48,2
8	139,2	69,6
24	189,5	94,7
48	198,8	99,4

Nach Analyse der Säurezahl wurde eine konjugierte Linolsäure mit einem Spaltgrad von > 99 % innerhalb von 48 h Reaktionsdauer als klare, schwach gelblich gefärbte Flüssigkeit erhalten.

Über gaschromatographische Analyse wurde das Isomerenmuster der enzymatisch hydrolysierten CLA mit dem Ausgangssubstrat CLA Methylester verglichen.

Tabelle 3:
Vergleich des Isomerenmusters nach enzymatischer Hydrolyse

Analyse:	CLA Me roh	CLA FFS roh
C16:0	3,8	4,3
C18:0	2,0	2,4
C18:1	16.8	17
C18:2	1,9	2
C18:2 c9,11t	37,5	37
C18:2 t10,c12	36,8	36,7
C18:2 cc Isomere	0,8	1
C18:2 tt Isomere	0,5	0,8
SZ		198,8

Im Rahmen der Messungenauigkeit hat keine signifikante Veränderung des Isomerenmusters durch die enzymatische Hydrolyse stattgefunden.

Beispiel 3

Hydrolyse von kurzkettigen konjugierten Linolsäuremethylestern unter kontinuierlichem Abstrippen von Wasser und Methanol.

Hydrolyseversuch nach Verfahren B)

In einen beheizbaren Kolben wurden 100 g konjugierter Linolsäuremethylester, 10 g Wasser und 5 g auf Polypropylen immobilisierte *Candida antarctica* B Lipase vorgelegt. Die Reaktion wurde mit aufgesetzter Destillationsbrücke bei einem verminderten Druck von 60 mbar und einer Temperatur von 60 °C durchgeführt. Wasser wurde kontinuierlich mit einer Flussrate von 0,25 ml/min (Beispiel 3A) und 0,5 ml/min (Beispiel 3B) in den Kolben gepumpt. Zudosiertes Wasser wurde schnell abdestilliert, so dass der Wassergehalt im Reaktor während der gesamten Reaktionsdauer gering (< 20 %) war. Die Umsetzung der Reaktion wurde über Bestimmung der Säurezahl verfolgt. Die Reaktionen wurden bei Teilumsatz nach 24 h abgebrochen und das immobilisierte Enzym vom Reaktionsgemisch abfiltriert. Dann wurde die organische Phase von der wässrigen Phase über Separation getrennt. Eine Säurezahl von 200 entsprach 100 % Umsatz. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst:

Tabelle 4
Umsatz unter Abstrippen von Wasser und Methanol nach unterschiedlichen Reaktionszeiten

Reaktionszeit [h]	Säurezahl Beispiel 3A	Umsatz [%] Beispiel 3A	Säurezahl Beispiel 3B	Umsatz [%] Beispiel 3B
0	0	0	0	0
2	51,5	25,7	62,3	31,1
4	71,2	35,6	84,4	42,4
6	87,0	43,5	100,2	50,1
8	100,0	50,0	112,2	56,1
24	153,0	76,5	167,1	83,5

Innerhalb von 24 h wurden je nach Menge des eindosierten Wasser Spaltgrade von 76,5 % bzw. 83,5 % erhalten. Die Destillatmenge in Beispiel 3A betrug nach 24 h 315 g und die destillatmenge in Beispiel 3B 584 g.

Beispiel 4

Hydrolyse von kurzkettigen konjugierten Linolsäureethylestern unter kontinuierlichem Abstrippen von Wasser und Ethanol.

Hydrolyseversuch nach Verfahren A)

In einen beheizbaren Kolben wurden 100 g konjugierter Linolsäureethylester, 100 g Wasser und 10 g auf Polypropylen immobilisierte *Thermomyces lanugenosus* Lipase vorgelegt. Die Reaktion wurde mit aufgesetzter Destillationsbrücke bei einem verminderten Druck von 30 mbar und einer Aussentemperatur von 60 °C durchgeführt. Wasser wurde kontinuierlich mit einer Flussrate von 0,5 ml/min in den Kolben gepumpt und im Kolben wurde ein Wassergehalt von 40 – 60 % eingestellt. Die Innentemperatur im Reaktor wurde dabei auf etwa 40 °C gehalten. Die Umsetzung der Reaktion wurde über Bestimmung der Säurezahl verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das immobilisierte Enzym vom Reaktionsgemisch abfiltriert und die organische Phase von der wässrigen Phase über Separation getrennt. Eine Säurezahl von 200 entsprach 100 % Umsatz. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst:

Tabelle 5
Umsatz unter Abstrippen von Wasser und Ethanol nach unterschiedlichen Reaktionszeiten

Reaktionszeit [h]	Säurezahl	Umsatz [%]
0	0	0
4	59,1	29,6 %
20	114	57 %
45	166	83 %

Nach Analyse der Säurezahl wurde eine konjugierte Linolsäure mit einem Spaltgrad von 83 % innerhalb von 45 h Reaktionsdauer als klare, farblose Flüssigkeit erhalten.

Beispiel 5

Hydrolyse von kurzkettigen konjugierten Linolsäuremethylestern durch mehrstufige Hydrolyse

Hydrolyseversuch nach Verfahren C)

In geschlossenen Gefässen wurden 3 Ansätze mit jeweils 20 g konjugiertem Linolsäuremethylester auf Basis von Sonnenblumenöl und 40 g Wasser eingewogen. Anschliessend wurden jeweils 1 g immobilisierte Lipase zugegeben und die Gemische wurden 5 h bei Raumtemperatur auf einer Magnetrührplatte gerührt. Danach wurden die Enzymimmobilisate abfiltriert und die organische Phase wurde von der wässrigen Phase über Separation getrennt. Zur organischen Phase wurden erneut 40 g Wasser gegeben und die abfiltrierten Enzymimmobilisate wurden erneut zur Reaktionslösung gegeben. Nach Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur wurden die Enzymimmobilisate erneut abfiltriert und die organische Phase wurde von der wässrigen Phase über Separation getrennt. Zur organischen Phase wurden 40 g Wasser gegeben und die abfiltrierten Enzymimmobilisate wurden erneut zur Reaktionslösung gegeben. Nach weiteren 5 h Reaktion bei Raumtemperatur wurde die Reaktion abgebrochen.

Folgende Enzymimmobilisate wurden eingesetzt:

5A) 1 g Novozym 435

5B) 1 g Candida antarctica B Lipase immobilisiert auf makroporöses Polypropylen

5C) 1g Thermomyces lanugenosus Lipase immobilisiert auf makroporöses Polypropylen

Die Umsetzung der Reaktion in den einzelnen Stufen wurde über Bestimmung der Säurezahl verfolgt. Eine Säurezahl von 200 entsprach dabei 100 % Umsatz. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst:

Tabelle 6
Umsatz in mehrstufiger Hydrolyse

Reaktions-zeit [h]	Säurezahl Beispiel 5A	Umsatz [%] Beispiel 5A	Säurezahl Beispiel 5B	Umsatz [%] Beispiel 5B	Säurezahl Beispiel 5C	Umsatz [%] Beispiel 5C
0	0	0	0			0
Stufe 1, nach 5 h	100,4	50,2	81,8	40,9	74,5	37,3
Stufe 2, nach16 h	142	71	127	63,5	117,2	58,6
Stufe 3 Nach 5 h	165,5	82,8	154,9	77,5	152,4	76,2

Beispiel 6

Hydrolyse von kurzkettigen konjugierten Linolsäureethylestern durch mehrstufige Hydrolyse

Hydrolyseversuch nach Verfahren C)

In geschlossenen Gefässen wurden 2 Ansätze mit jeweils 20 g konjugiertem Linolsäureethylester auf Basis von Distelöl und 40 g Wasser eingewogen. Anschliessend wurden jeweils 200 mg nicht immobilisierte bzw. 1 g immobilisierte Lipase zugegeben. Die Ansätze wurden behandelt wie in Beispiel 5 beschrieben. Vom nicht immobilisiertem Enzym wurden in jeder Spaltstufe 200 mg frisches Enzym zugesetzt. Folgende Enzyme wurden eingesetzt:

6A) 200 mg Lipomod 34 (Candida cylindracea Lipase) pro Stufe

6B) 1 g Novozym 435 (Chromobacterium viscosum Lipase) pro Stufe

Die Umsetzung der Reaktion in den einzelnen Stufen wurde über Bestimmung der Säurezahl verfolgt. Eine Säurezahl von 200 entsprach dabei 100 % Umsatz. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst:

Tabelle 7
Umsatz in mehrstufiger Hydrolyse

Reaktions-zeit [h]	Säurezahl Beispiel 6A	Umsatz [%] Beispiel 6A	Säurezahl Beispiel 6B	Umsatz [%] Beispiel 6B
0	0	0	0	
Stufe 1, nach 5 h	56,6	28,3	101,9	51
Stufe 2, nach16 h	83,9	42	123	61,5
Stufe 3 Nach 5 h	122	61	143	71,5

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure, bei dem man

   (a) konjugierte Linolsäureniedrigalkylester in Gegenwart von Enzymen mit Wasser unter kontinuierlicher Alkoholentfernung hydrolysiert,
   (b) das Hydrolysat in eine organische und eine wässrig/alkoholische Phase auftrennt, und
   (c) die die konjugierte Linolsäure enthaltende organische Phase von nicht-umgesetzten konjugierten Linolsäureniedrigalkylestern befreit.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man konjugierte Linolsäureniedrigalkylester der Formel (I) einsetzt,

   $R^1CO\text{-}OR^2$ (I)

   in der R^1CO für den Acylrest einer Linolsäure mit konjugierten Doppelbindungen und R^2 für einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen steht.

3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die Hydrolyse mit Lipasen und/oder Esterasen in freier oder immobilisierter Form durchführt.

4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man Lipasen und/oder Esterasen einsetzt, die ausgewählt sind aus der Gruppe von Mikroorganismen, die gebildet wird von *Alcaligenes, Aspergillus niger, Candida antarctica A, Candida antarctica B, Candida cylindracea, Chromobacterium viscosum, Rhizomucor miehei, Penicilium camenberti, Penicilium roqueforti, Porcine pancreas, Pseudomonas cepacia, Pseudomonas fluorescens, Rhizopus javanicus, Rhizopus oryzae, Thermomyces lanugenosus.*

5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man die Hydrolyse bei Temperaturen im Bereich von 20 bis 80 °C durchführt.

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man die Hydrolyse bis zu einem Spaltgrad von 60 bis 100 Gew.-% durchführt.

7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man während der Hydrolyse im Reaktor einen konstanten Wassergehalt im Bereich von 30 bis 70 Gew.-% im Reaktor einstellt und mit einem Vakuum von 20 – 60 ± 5 mbar kontinuierlich ein Alkohol / Wasser Gemisch abtrennt.

8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man während der Hydrolyse im Reaktor einen Wassergehalt im Bereich von 0 bis 20 Gew.-% einstellt und bei einem Vakuum von 20 – 60 ± 5 mbar kontinuierlich ein Alkohol / Wasser Gemisch abtrennt.

9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man die Hydrolyse ohne Anlegen eines Vakuums in mehreren Stufen durchführt, wobei jeweils 50 – 75 Gew.-% Wasser eingesetzt werden.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/05598

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12P7/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 097 708 A (UNILEVER PLC ;UNILEVER NV (NL)) 9 May 2001 (2001-05-09) siehe insebsondere Anspruch 13 the whole document ---	1-9
X	MCNEILL G P ET AL: "ENZYMATIC ENRICHMENT OF CONJUGATED LINOLEIC ACID ISOMERS AND INCORPORATION INTO TRIGLYCERIDES" JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. CHAMPAIGN, US, vol. 76, no. 11, November 1999 (1999-11), pages 1265-1268, XP001026473 ISSN: 0003-021X siehe insebsondere S. 1267 the whole document --- -/--	1-9

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
1 October 2003	30/10/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Douschan, K

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAAS M J ET AL: "LIPASE-CATALYZED FRACTIONATION OF CONJUGATED LINOLEIC ACID ISOMERS" LIPIDS, CHAMPAIGN, IL, US, vol. 34, no. 9, September 1999 (1999-09), pages 979-987, XP001056347 ISSN: 0024-4201 siehe insbesondere S. 981 the whole document	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat[redacted] Application No
PCT/EP 03/05598

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1097708 A	09-05-2001	EP 1097708 A1	09-05-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat[redacted]es Aktenzeichen
PCT/EP 03/05598

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12P7/64

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 1 097 708 A (UNILEVER PLC ;UNILEVER NV (NL)) 9. Mai 2001 (2001-05-09) siehe insebsondere Anspruch 13 das ganze Dokument ---	1-9
X	MCNEILL G P ET AL: "ENZYMATIC ENRICHMENT OF CONJUGATED LINOLEIC ACID ISOMERS AND INCORPORATION INTO TRIGLYCERIDES" JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. CHAMPAIGN, US, Bd. 76, Nr. 11, November 1999 (1999-11), Seiten 1265-1268, XP001026473 ISSN: 0003-021X siehe insebsondere S. 1267 das ganze Dokument --- -/--	1-9

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
1. Oktober 2003	30/10/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Douschan, K

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HAAS M J ET AL: "LIPASE-CATALYZED FRACTIONATION OF CONJUGATED LINOLEIC ACID ISOMERS" LIPIDS, CHAMPAIGN, IL, US, Bd. 34, Nr. 9, September 1999 (1999-09), Seiten 979-987, XP001056347 ISSN: 0024-4201 siehe insbesondere S. 981 das ganze Dokument	1-9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/05598

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1097708 A	09-05-2001	EP 1097708 A1	09-05-2001