



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 667 284 A5

⑤① Int. Cl.⁴: C 12 P 7/62 7/62

// (C 12 P 7/62, C 12 R 1:01)

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer:	2181/86	㉗ Inhaber:	Yoshikawa Oil & Fat Co., Ltd, Tennji-ku/Osaka (JP)
㉑ Anmeldungsdatum:	29.05.1986	㉘ Erfinder:	Myojo, Katsunori, Kakogawa-shi/Hyogo-ken (JP) Matsufune, Youichi, Kakogawa-shi/Hyogo-ken (JP) Yoshikawa, Shiro, Ashiya-shi/Hyogo-ken (JP)
㉓ Priorität(en):	29.08.1985 JP 60-190543 16.01.1986 JP 61-7732	㉙ Vertreter:	R. A. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich
㉔ Patent erteilt:	30.09.1988		
㉕ Patentschrift veröffentlicht:	30.09.1988		

⑤④ **Verfahren zur Herstellung von Fettsäure-Estern.**

⑤⑦ Eine Komponente (1), die aus der von Sterinen und verzweigt-kettigen aliphatischen primären oder sekundären Alkoholen mit 14 bis 32 Kohlenstoffatomen gebildeten Gruppe ausgewählt ist, wird mit einer Komponente (2) umgesetzt, die aus der von Fettsäuren und Fettsäure-Estern gebildeten Gruppe ausgewählt ist. Die Umsetzung wird in Kontakt mit einem Enzym durchgeführt, das aus der von Lipase und Cholesterin-Esterase gebildeten Gruppe ausgewählt ist, oder mit dem ausgewählten Enzym in einer immobilisierten Form. Die Umsetzung findet in einem System statt, das aus der von einem wässrigen Medium und einem wasserhaltigen organischen Lösungsmittel gebildeten Gruppe ausgewählt ist. Das Verfahren wird zur Herstellung eines Fettsäure-Esters der Komponente (1) angewandt.

Vorzugsweise wird Lipase von einem Mikroorganismus, dessen Genus aus der von *Achromobacter*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Aspergillus*, *Candida*, *Humicola*, *Penicillium*, *Torulopsis*, *Mucor*, *Bacillus*, *Thermomyces*, *Rhizopus*, *Pseudomonas* und *Alcaligenes* gebildeten Gruppe ausgewählt ist, und Cholesterin-Esterase von einem Mikroorganismus, dessen Genus aus der von *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Fusarium*, *Nocardia*, *Streptomyces* und *Candida* gebildeten Gruppe ausgewählt ist, hergeleitet. Vorzugsweise ist die Komponente (1) ein Sterin und die Komponente (2) eine

Fettsäure, ein Glycerin-Ester davon oder ein Öl, Fett oder Wachs.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Umsetzung von einer Komponente (1), die aus der von Sterinen und verzweigt-kettigen aliphatischen primären oder sekundären Alkoholen mit 14 bis 32 Kohlenstoffatomen gebildeten Gruppe ausgewählt ist, mit einer Komponente (2), die aus der von Fettsäuren und Fettsäure-Estern gebildeten Gruppe ausgewählt ist, in Kontakt mit einem Enzym, das aus der von Lipase und Cholesterin-Esterase gebildeten Gruppe ausgewählt ist, oder mit dem ausgewählten Enzym in einer immobilisierten Form, in einem System, das aus der von einem wässrigen Medium und einem wasserhaltigen organischen Lösungsmittel gebildeten Gruppe ausgewählt ist, zur Herstellung eines Fettsäure-Esters der Komponente (1).

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem das Enzym Lipase ist, die von einem Mikroorganismus hergeleitet ist, dessen Genus aus der von Genus *Achromobacter*, Genus *Chromobacterium*, Genus *Corynebacterium*, Genus *Staphylococcus*, Genus *Aspergillus*, Genus *Candida*, Genus *Humicola*, Genus *Penicillium*, Genus *Torulopsis*, Genus *Mucor*, Genus *Bacillus*, Genus *Thermomyces*, Genus *Rhizopus*, Genus *Pseudomonas* und Genus *Alcaligenes* gebildeten Gruppe ausgewählt ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, bei welchem die Lipase von einem Mikroorganismus hergeleitet ist, dessen Genus aus der von Genus *Chromobacterium*, Genus *Aspergillus*, Genus *Candida* und Genus *Rhizopus* gebildeten Gruppe ausgewählt ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem das Enzym Cholesterin-Esterase ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, bei welchem die Cholesterin-Esterase von einem Mikroorganismus, dessen Genus aus der von Genus *Pseudomonas*, Genus *Achromobacter*, Genus *Fusarium*, Genus *Nocardia*, Genus *Streptomyces* und Genus *Candida* gebildeten Gruppe ausgewählt ist, hergeleitet ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem die Komponente (1) ein Sterin ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem die Komponente (1) ein verzweigt-kettiger aliphatischer primärer oder sekundärer Alkohol mit 14 bis 32 Kohlenstoffatomen ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem die Komponente (2) eine Fettsäure ist, die aus der von gesättigten geradkettigen Fettsäuren, gesättigten verzweigt-kettigen Fettsäuren, ungesättigten Fettsäuren, Hydroxy-Fettsäuren und Polycarbonsäuren mit bis zu 32 Kohlenstoffatomen gebildeten Gruppe ausgewählt ist.

9. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem die Komponente (2) ein natürliches Öl oder Fett, ein synthetisches Öl oder Fett, ein natürliches Wachs oder ein synthetisches Wachs ist.

10. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem die Komponente (2) ein Glycerin-Ester von einer Fettsäure mit bis zu 32 Kohlenstoffatomen ist.

11. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem die Komponente (2) ein Ester von einer aliphatischen Säure mit 1 bis 14 Kohlenstoffatomen ist.

12. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem die Umsetzung in einem wässrigen Medium durchgeführt wird.

13. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem die Umsetzung in einem wasserhaltigen organischen Lösungsmittel durchgeführt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, bei welchem das wasserhaltige organische Lösungsmittel ein mit Wasser gesättigtes Kohlenwasserstoff-Lösungsmittel ist.

15. Verfahren nach Anspruch 13, bei welchem das wasserhaltige organische Lösungsmittel die beiden Phasen Wasser und organisches Lösungsmittel umfasst.

16. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem das Enzym durch Phasentrennung, Filtration oder Zentrifugation von der resultierenden Reaktionsmischung getrennt wird.

17. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem man eine poröse Membran verwendet und die Komponente (1) sowie die Komponente (2) durch die Mikroporen der Membran hindurch mit dem Enzym in Kontakt gebracht werden.

18. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem man das Enzym in einem immobilisierten Zustand verwendet.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass das immobilisierte Enzym mittels eines Einbettungsverfahrens unter Verwendung eines Vorpolymeren von einem photovernetzbaren Harz oder eines Vorpolymeren von Urethan als Träger erhalten wurde.

20. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass das immobilisierte Enzym mittels eines Kovalentbindungsverfahrens unter Verwendung eines anorganischen oder organischen Trägers erhalten wurde.

21. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass das immobilisierte Enzym mittels eines Adsorptionsverfahrens unter Verwendung eines anorganischen oder organischen Trägers erhalten wurde.

BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Sterin-Estern oder von spezifischen aliphatischen Alkohol-Estern von Fettsäuren unter Verwendung eines Enzyms.

Ester von Sterinen mit Fettsäuren werden in verschiedenen Bereichen in grossem Umfang verwendet, beispielsweise als cholesterische Flüssigkristalle (vgl. die veröffentlichte ungeprüfte japanische Patentanmeldung Sho-52-24992) und als hydrophile Basisstoffe für pharmazeutische und kosmetische Mittel (vgl. die veröffentlichten ungeprüften japanischen Patentanmeldungen Sho-52-41215 und Sho-52-79030).

Solche Fettsäure-Sterin-Ester und dergleichen wurden bisher ausschliesslich mittels organischer Syntheseverfahren hergestellt, die im allgemeinen unter schwierigen Reaktionsbedingungen durchgeführt werden, eine Nebenreaktion miteinbeziehen und komplexe Verfahrensweisen zur Durchführung der Reaktion und zur anschließenden Isolierung und Reinigung des gewünschten Produkts erfordern. Die Hydroxyl-Gruppe von Sterinen ist sekundär und liegt nahe zum Steroid-Skelett, sie weist daher eine verminderte Reaktivität auf. Zur Herstellung von Fettsäure-Estern durch Umsetzung von Fettsäuren mit Sterinen ist es nötig, die Ausgangsstoffe bei einer hohen Temperatur während einer langen Zeitdauer unter Verwendung von einem sauren Katalysator umzusetzen, oder die Fettsäure vor der Veresterung erst zu einem Säureanhydrid oder Säurehalid zu konvertieren. Wenn zudem der Sterin-Ausgangsstoff Trimethylsterin ist, das zwei Methyl-Gruppen in 4-Stellung am Steroid-Skelett, eine Methyl-Gruppe in 14-Stellung und eine Hydroxyl-Gruppe in 3-Stellung aufweist, weist die Verbindung wegen der sterischen Behinderung der beiden Methyl-Gruppen in 4-Stellung eine noch verminderte Reaktivität auf, und sie ist mit einer Fettsäure schwer zu verestern, sofern die Säure nicht zu einem Säurehalid konvertiert ist. Jedoch sind Sterin-Ester, die für verschiedene Anwendungen verwendbar sind, im allgemeinen langkettige Fettsäure-Ester, und langkettige Fettsäure-Halide, die als Ausgangsstoffe zur Herstellung von solchen Estern dienen, sind im allgemeinen schwer herzustellen, müssen mittels eines komplexen Verfahrens spezifisch hergestellt werden und sind sehr teuer. Ausserdem sind diese Fettsäure-Halide im allgemeinen instabil und sie

neigen zur Zersetzung in Gegenwart von Feuchtigkeit, sie können während der Reaktion ein stimulierendes korrosives Nebenprodukt erzeugen und sie erfordern einen speziellen Reaktor oder dergleichen. Zur Herstellung von Fettsäure-Estern durch Umsetzung von Sterinen mit Fettsäure-Estern ist es nötig, die Ausgangsstoffe bei einer hohen Temperatur während einer langen Zeitdauer in Gegenwart von einem anorganischen Katalysator wie Natrium-Alkoholat umzusetzen.

Derartige organisch-chemische Verfahren haben den Nachteil, dass sie eine niedrige Selektivität der Reaktion aufweisen, sowie eine Zerstörung des Substrats und wegen der Verwendung von schwierigen Bedingungen den Verbrauch einer grossen Energiemenge zur Folge haben. Zudem haben sie den grossen Nachteil, dass sie das Abscheiden des Katalysators erfordern und eine niedrige Reaktionsausbeute ergeben.

In den letzten Jahren bezog sich einige Forschung auf Verfahren zur Synthese von Glyceriden und Terpen-Estern durch die Rückreaktion von Hydrolasen wie Lipase anstelle der Verwendung von organischer Synthese. Trotzdem wurde nichts berichtet über Verfahren, in denen Enzyme zur Synthese von Estern aus Fettsäuren oder Fettsäure-Estern und Sterinen oder aus verzweigt-kettigen aliphatischen primären oder sekundären Alkoholen mit 14 bis 32 Kohlenstoffatomen verwendet werden.

Im allgemeinen sind Enzymreaktionen substratspezifisch und es ist unmöglich, den Ablauf einer enzymatischen Synthesereaktion vorauszu sehen, wenn eine andere Verbindung als in Betracht kommendes Substrat verwendet wird. Es ist auch bekannt, dass im allgemeinen das Gleichgewicht einer Synthesereaktion mit Lipase grösstenteils zur Rückreaktion hin verlagert ist. Auch die vorgenannten, in den letzten Jahren untersuchten Verfahren erfordern besondere Mittel wie die weitestmögliche Verminderung der Menge Wasser im Reaktionssystem, um das Gleichgewicht zur Synthese hin zu verlagern. Die Verwendung von solchen Notbehelfen führt zu einer Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit und ergibt im allgemeinen den gewünschten Ester mit einer verminderten Ausbeute.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung eines gewünschten Esters unter milden Bedingungen bei Verwendung eines Enzyms zu schaffen, das jedoch nicht auf organische Synthese mit den ihr innewohnenden Nachteilen wie schwierige Reaktionsbedingungen zurückgreift.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur wirtschaftlichen und leichten Herstellung des gewünschten Esters mit hoher Ausbeute zu schaffen.

Eine noch weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung des gewünschten Esters mittels eines kontinuierlichen oder halbkontinuierlichen Syntheseverfahrens bei wiederholter Verwendung eines Enzyms zu schaffen.

Diese und noch andere Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden aus der nachstehenden Beschreibung hervorgehen.

Die vorliegende Erfindung schafft ein Verfahren zur Umsetzung von einer Komponente (1), die aus der von Sterinen und verzweigt-kettigen aliphatischen primären oder sekundären Alkoholen mit 14 bis 32 Kohlenstoffatomen gebildeten Gruppe ausgewählt ist, mit einer Komponente (2), die aus der von Fettsäuren und Fettsäure-Estern gebildeten Gruppe ausgewählt ist, in Kontakt mit einem Enzym, das aus der von Lipase und Cholesterin-Esterase gebildeten Gruppe ausgewählt ist, oder mit dem ausgewählten Enzym in einer immobilisierten Form, in einem System, das aus der von einem wässrigen Medium und einem wasserhaltigen organi-

schen Lösungsmittel gebildeten Gruppe ausgewählt ist, zur Herstellung eines Fettsäure-Esters der Komponente (1).

Das erfindungsgemässe Verfahren liefert den gewünschten Ester leicht und mit hoher Ausbeute unter sehr milden Bedingungen und vermindertem Energieverbrauch bei Verwendung eines Enzyms ohne schwierige Reaktionsbedingungen, ohne getrennte Herstellung von Ausgangsstoffen und ohne speziellen Reaktor oder dergleichen, die in konventionellen Verfahren zur organischen Synthese nötig sind, und zudem ohne Nachteile wie schlechte Selektivität der Reaktion, Zerstörung des Substrats, Verwendung von zusätzlichem Katalysator und dessen Abscheidung zur Folge zu haben.

Zudem kann mit dem erfindungsgemässen Verfahren die Reaktion kontinuierlich oder halbkontinuierlich bei wiederholter Verwendung des Enzyms durchgeführt werden, so dass das Verfahren automatisch ablaufen kann, wobei der Ester leicht herzustellen ist und eine wesentliche Verminderung des Arbeitsaufwandes, der Herstellungskosten und der Installationskosten erreicht wird.

Im allgemeinen ist es bei der Synthese von Glyceriden unter Verwendung von Lipase wesentlich nötig, die Menge Wasser im Reaktionssystem weitestmöglich bis auf ein zum Vorhandensein der Enzymaktivität erforderlichen Minimums zu vermindern, um der Synthesereaktion zu ermöglichen, günstig abzulaufen, wobei das Enzym in Gegenwart einer verminderten Menge Wasser nicht fähig ist, seine volle Aktivität zu entfalten, und eine Tendenz zur Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit besteht. Trotzdem ermöglicht die erfindungsgemässe Kombination von Substraten einen vorteilhaften Ablauf der Synthesereaktion mit einer genügend hohen Geschwindigkeit, auch wenn das Reaktionssystem eine grosse Menge Wasser enthält. Das vorliegende Verfahren ist daher zur industriellen Anwendung besonders geeignet.

Das im erfindungsgemässen Verfahren zu verwendende Enzym ist aus der von Lipase und Cholesterin-Esterase gebildeten Gruppe ausgewählt. Der Terminus «Lipase» bezieht sich auf ein Enzym zur Katalyse der schrittweisen Hydrolyse eines Glycerids zu Glycerin und einer Fettsäure. Der Terminus «Cholesterin-Esterase» bezieht sich auf ein Enzym zur Hydrolyse des Esters von Cholesterin und einer Fettsäure. Lipase und Cholesterin-Esterase sind in bezug auf ihre Quelle nicht spezifisch beschränkt, sie können von verschiedenen Mikroorganismen, Tieren und Gemüsearten hergeleitet werden.

Beispiele von Mikroorganismen, von denen Lipase hergeleitet ist, sind Mikroorganismen vom Genus *Achromobacter* wie *Achromobacter iofurgus* und *Achromobacter lipolyticum*, Genus *Chromobacterium* wie *Chromobacterium viscosum*, Genus *Corynebacterium* wie *Corynebacterium acnes*, Genus *Staphylococcus* wie *Staphylococcus aureus*, Genus *Aspergillus* wie *Aspergillus niger*, Genus *Candida* wie *Candida cylindracea*, Genus *Humicola* wie *Humicola lanuginosa*, Genus *Penicillium* wie *Penicillium caseicolum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium cyclopium* und *Penicillium roqueforti*, Genus *Torulopsis* wie *Torulopsis ernobii*, Genus *Mucor* wie *Mucor miehei*, Genus *Bacillus* wie *Bacillus subtilis*, Genus *Thermomyces* wie *Thermomyces ibadanensis*, Genus *Rhizopus* wie *Rhizopus delemar*, Genus *Pseudomonas* wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi* und *Pseudomonas fluorescens*, Genus *Alcaligenes* wie *Alcaligenes sp.*, usw.

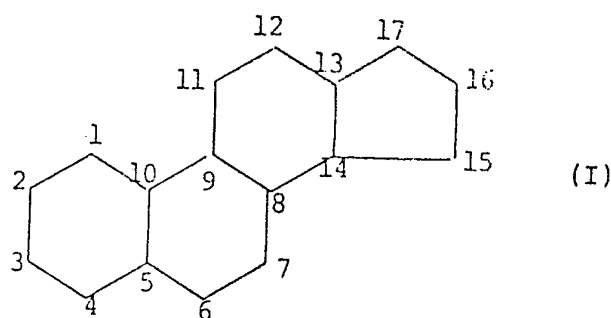
Beispiele von verwendbaren Quellen, aus denen Cholesterin-Esterase hergeleitet werden kann, sind diejenigen von tierischen Geweben wie Milz, Leber, Gehirn, Nebenniere, Hoden, Eierstock, usw. Mikroorganismen sind als Quellen bevorzugt verwendbar. Beispiele von Mikroorganismen sind

solche vom Genus *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas fluorescens*, Genus *Achromobacter* wie *Achromobacter delicatulus*, Genus *Fusarium*, Genus *Nocardia*, Genus *Streptomyces*, Genus *Candida* wie *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis*, *Candida intermedia* und *Candida cylindracea*, usw.

Grösstenteils sind Enzyme aus diesen Quellen als gereinigte Enzyme im Handel erhältlich. Obwohl diese Handelsprodukte bei der Ausübung der Erfindung unverändert verwendbar sind, brauchen nicht immer gereinigte Handelsprodukte verwendet zu werden. Ähnlich verwendbar sind beispielsweise Zellen vom Mikroorganismus selbst, das zur Erzeugung des betreffenden Enzyms fähig ist, eine Kultur solcher Zellen, eine durch Behandlung der Kultur erhaltene rohe Enzymlösung, eine das Enzym enthaltende Zusammensetzung, usw.

Das bei der Ausübung der Erfindung zu verwendende immobilisierte Enzym kann irgendeines von denen sein, die durch Immobilisierung der vorgenannten Enzyme auf geeigneten Trägern mittels eines herkömmlichen Verfahrens hergestellt werden können. Das immobilisierte Enzym und dessen Herstellung wird weiter unten im einzelnen beschrieben werden.

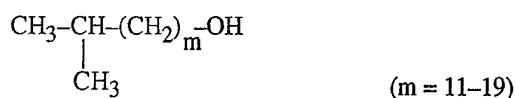
Das Sterin, das als eines der Substrate zu verwenden und einer Synthesereaktion unter Verwendung des Enzyms oder des immobilisierten Enzyms zu unterziehen ist, ist eine Verbindung mit einem Steroid-Skelett und einer Hydroxyl-Gruppe im Molekül. Das Steroid-Skelett ist durch die nachfolgende Formel (I) darstellbar:



Im allgemeinen ist die Hydroxyl-Gruppe direkt am Skelett gebunden. Beispiele von verwendbaren Sterinen sind Cholesterin, 7-Dehydrocholesterin, β -Cholestanin, Coprostanin, Lathosterin, Zymosterin, Zymostenin, Desmosterin, Brassicasterin, Ergosterin, Campesterin, β -Sitosterin, γ -Sitosterin, α -Spinasterin, Stigmasterin, Trimethylsterine umfassend Lanosterin, Dihydrolanosterin, Agnosterin und Dihydroagnosterin, aus Wollwachs als Mischung solcher Sterine abgechiedenes Isocholesterin, Cycloartenin, usw.

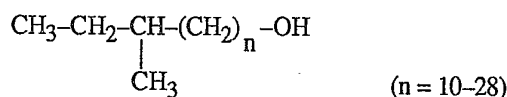
Erfindungsgemäss ist ein verzweigt-kettiger aliphatischer primärer oder sekundärer Alkohol mit 14 bis 32 Kohlenstoffatomen als eines der Substrate anstelle von oder zusammen mit dem Sterin verwendbar. Solche Alkohole können gesättigt oder ungesättigt, und monohydrisch, dihydrisch oder polyhydrisch sein, und es kann eine Mischung davon verwendet werden. Beispiele solcher Alkohole sind wie folgt:

(a) Verzweigt-kettige aliphatische gesättigte Alkohole der Formel



und solche der Formel

4



5

Besondere Beispiele von diesen Alkoholen sind 14-Methylhexadecanol-1, 16-Methyloctadecanol-1, 18-Methylnonadecanol-1, 18-Methylcosanol, 20-Methylhenicosanol, 20-Methylhydocosanol, 22-Methyltricosanol, 22-Methyltetracosanol, 24-Methylpentacosanol-1, 24-Methylhexacosanol und Mischungen solcher Alkohole wie beispielsweise «Lanolin Alcohol HH» (ein Produkt der Yoshikawa Oil and Fat Co., Ltd.), eine aus Lanolin-Alkoholen durch Lösungsmittel-

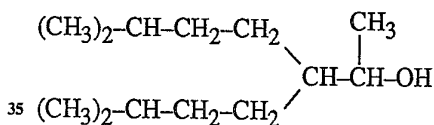
15 Fraktionierung abgeleitete Mischung von aliphatischen höheren Alkoholen-Glykolen, die frei von Sterin ist und hauptsächlich aus verzweigt-kettigen aliphatischen gesättigten Lanolin-Alkoholen mit 18 bis 32 Kohlenstoffatomen besteht.

20 (b) Verzweigt-kettige synthetische Alkohole wie Hexadecylalkohol (ein Produkt der Esso Standard), NJCOL 160A, 160B, 181A, 200A und 200C (Produkte der New Japan Chemical), Fine Oxocol 1800 (ein Produkt der Nissan Chemical Industries, Ltd.), DIADOL 18G (ein Produkt der

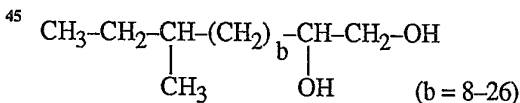
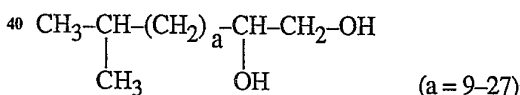
25 Mitsubishi-Kaesi), Octyldodecanol (ein Produkt der Henkel International GmbH), usw.

(c) Verzweigt-kettige synthetische sekundäre Alkohole, darunter Isotridecylalkohol (ein Produkt der Kuraray Co., Ltd.) und diejenige, welche durch die nachstehende Formel dar-

stellbar sind:



(d) α , β -Diole der nachstehenden Formeln:



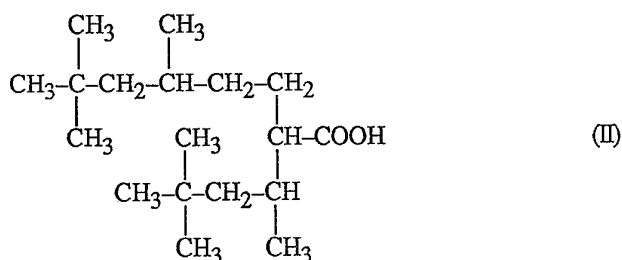
50 Erfindungsgemäss wird als Stoff des anderen Substrats eine Fettsäure oder ein Fettsäure-Ester verwendet.

Die verwendbaren Fettsäuren umfassen gesättigte geradkettige Fettsäuren, gesättigte verzweigt-kettige Fettsäuren, ungesättigte Fettsäuren, Hydroxy-Fettsäuren und Polycarbonsäuren mit bis zu 32 Kohlenstoffatomen, usw.

Beispiele von verwendbaren gesättigten geradkettigen Fettsäuren umfassen solche, die eine gerade Zahl von Kohlenstoffatomen haben, wie Essigsäure, Buttersäure, Capronsäure, Caprylsäure, Caprinsäure, Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Arachinsäure, Behensäure, Lignocerinsäure, Hexacosansäure, Octacosansäure, Triacotansäure und n-Dotriacontansäure, und solche, die eine ungerade Zahl von Kohlenstoffatomen haben, wie Propionsäure, n-Valeriansäure, Oenanthsäure, Pelargonsäure, 65 Hendecansäure, Tridecansäure, Pentadecansäure, Heptadecansäure, Nonadecansäure, Henicosansäure, Tricosansäure, Pentacosansäure und Heptacosansäure.

Beispiele von verwendbaren gesättigten verzweigt-kettigen

Fettsäuren umfassen Isobuttersäure, Isocaprinsäure, Isocaprylsäure, Isocaprinsäure, Isolaurinsäure, 11-Methyldodecansäure, Isomyristinsäure, 13-Methyltetradecansäure, Isopalmitinsäure, 15-Methylhexadecansäure, Isostearinsäure, 17-Methyloctadecansäure, Isoarachinsäure, 19-Methylcosansäure, α -Ethylhexansäure, α -Hexyldecansäure, α -Heptylundecansäure, 2-Decyltetradecansäure, 2-Undecyltetradecansäure, 2-Decylpentadecansäure, 2-Undecylpentadecansäure und Fine Oxocol 1800 (ein Produkt der Nissan Chemical Industries, Ltd.), welches durch die nachstehende Formel (II) darstellbar ist:



Verwendbare gesättigte verzweigte Fettsäuren, die eine ungerade Zahl von Kohlenstoffatomen haben, umfassen Antiso-Fettsäuren, die mit einer Isobutyl-Gruppe enden, wie 6-Methyloctansäure, 8-Methyldecansäure, 10-Methyldodecansäure, 12-Methyltetradecansäure, 14-Methylhexadecansäure, 16-Methyloctadecansäure, 18-Methylcosansäure, 20-Methyldocosansäure, 22-Methyltetracosansäure, 24-Methylhexacosansäure und 26-Methyloctacosansäure.

Beispiele von verwendbaren ungesättigten Fettsäuren umfassen 4-Decensäure, Caprolensäure, 4-Dodecensäure, 5-Dodecensäure, Laurolensäure, 4-Tetradecensäure, 5-Tetradecensäure, 9-Tetradecensäure, Palmitolensäure, 6-Octadecensäure, Ölsäure, 9-Octadecensäure, 11-Octadecensäure, 9-Icosensäure, cis-11-Icosensäure, Cetolensäure, 13-Docosensäure, 15-Tetracosensäure, 17-Hexacosensäure, 6,9,12,15-Hexadecatetraensäure, Linolsäure, Linolensäure, α -Eleostearinsäure β -Eleostearinsäure, Punicinsäure, 6,9,12,15-Octadecatetraensäure, Parinarinsäure, 5,8,11,14-Icosatetraensäure, 5,8,11,14,17-Icosapentaensäure, 7,10,13,16,19-Docosapentaensäure, 4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure und dergleichen.

Beispiele von verwendbaren Hydroxy-Fettsäuren umfassen α -Hydroxylaurinsäure, α -Hydroxymyristinsäure, α -Hydroxypalmitinsäure, α -Hydroxystearinsäure, ω -Hydroxylaurinsäure, α -Hydroxyarachinsäure, 9-Hydroxy-12-octadecensäure, Ricinolsäure, α -Hydroxybehensäure, 9-Hydroxytrans-10,12-Octadecadiensäure, Kamolensäure, Ipurolsäure, 9,10-Dihydroxystearinsäure, 12-Hydroxystearinsäure und dergleichen.

Beispiele von verwendbaren Polycarbonsäuren umfassen Oxalsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Glutarsäure, Adipinsäure, Pimelinsäure, Korksäure, Azelainsäure, Sebacinsäure, D,L-Apfelsäure und dergleichen.

Zum Zwecke der erfindungsgemässen Reaktion können diese Fettsäuren einzeln verwendet werden, oder es können mindestens zwei dieser Säuren aus derselben Gruppe oder aus verschiedenen Gruppen in Mischung verwendet werden. Wenn mindestens zwei Säuren in Kombination verwendet werden, ist beispielsweise Lanolin-Fettsäure, eine Mischung von gesättigten geradkettigen und verzweigten Fettsäuren sowie Hydroxy-Fettsäuren, vorzugsweise verwendbar.

Als das andere erfindungsgemässe Substrat verwendbare Fettsäure-Ester umfassen Glycerin-Ester der vorangehenden Fettsäuren und Ester dieser Säuren mit 1 bis 32 und vorzugsweise bis zu 14 Kohlenstoffatomen. Die aliphatischen Alkohole mit 1 bis 32 Kohlenstoffatomen, die als alkoholische

Komponente dieser Ester dienen können, können monohydriert oder dihydriert und geradkettig oder verzweigt sein. Unter diesen Alkoholen sind solche besonders bevorzugt, die 1 bis 6 Kohlenstoffatome aufweisen, wie Methylalkohol, Ethylalkohol, n-Propylalkohol, Isopropylalkohol, n-Butylalkohol, Isobutylalkohol, n-Hexylalkohol und dergleichen.

Die Glycerin-Ester der Fettsäuren können Monoglyceride, Diglyceride oder Triglyceride oder Mischungen solcher Glyceride sein. Demzufolge umfassen als erfindungsgemässe Ausgangsstoffe verwendbare Fettsäure-Ester natürliche und synthetische Öle und Fette (Glyceride), natürliche und synthetische Wachse, usw. Beispiele von verwendbaren natürlichen Ölen und Fetten sind Speiseöle wie Leinsamenöl, Olivenöl, Kakaobutter, Reiskleienöl, Sojabohnenöl, Tsubakiöl, Rapsamenöl, Palmöl, Palmkernöl, Ricinusöl, Baumwollsaamenöl, Japanwachs, Kokosnussöl, Erdnussöl, Sonnenblumenöl und dergleichen, tierische Öle wie Talg, Butterfett, Schafstalg, Walöl, Lebertran, Sardinenöl, Heringöl und dergleichen, hydrogenierte Öle solcher Öle. Beispiele von verwendbaren natürlichen Wachsen sind Walrat, Insektenwachs, Karnaubawachs, Candelillawachs, Reiskleienwachs, Schellack, Bienenwachs, Montanwachs, Wollenwachs, Baumwollenwachs und dergleichen.

Zum Zwecke der erfindungsgemässen Reaktion können diese Fettsäure-Ester einzeln verwendet werden, oder es können mindestens zwei davon in Mischung verwendet werden.

Das erfindungsgemässe Verfahren kann chargenweise, halbkontinuierlich oder kontinuierlich durchgeführt werden. In jedem dieser Fälle kann die Reaktion durchgeführt werden, indem die Komponente (1) und die Komponente (2) als Substrate mit dem vorstehend genannten Enzym oder immobilisierten Enzym in Kontakt gebracht werden. Während die Reaktion nur abläuft, wenn die Substrate mit dem Enzym in Kontakt gebracht werden, ist es im allgemeinen wünschenswert, diese durch Rühren miteinander zu vermischen. Die Forschungsergebnisse der Erfinder zeigen, dass die Reaktion in einem System mit einem wässrigen Medium oder in einem System mit einem wasserhaltigen organischen Lösungsmittel (welches die beiden Phasen Wasser und organisches Lösungsmittel umfasst) gut durchführbar ist, und dass das Synthese-Verhältnis des gewünschten Produkts von einem Einfluss des Reaktionssystems fast frei ist.

Der Terminus «System mit einem wässrigen Medium» bezieht sich auf ein Reaktionssystem, welches das Enzym, die Substrate und Wasser oder die Kombination von Wasser und einem hydrophilen Stoff zur Lösung des Enzyms umfasst. Der Terminus «System mit einem wasserhaltigen organischen Lösungsmittel» bezieht sich auf ein System, welches ein wasserhaltiges organisches Lösungsmittel umfasst, das fähig ist, zumindest eines der Substrate zu lösen, d.h. ein System, welches die Substrate, das mit Wasser oder mit der Kombination von Wasser und einem hydrophilen Stoff aktivierte Enzym, und ein wasserhaltiges organisches Lösungsmittel umfasst, das fähig ist, zumindest eines der Substrate zu lösen. Der Terminus «wasserhaltiges organisches Lösungsmittel» bedeutet ein organisches Lösungsmittel, das Wasser bis zur Sättigung oder in einer noch grösseren Menge enthält. Wenn der Wassergehalt dieses Systems die Löslichkeit des organischen Lösungsmittels überschreitet, umfasst das System zwei Phasen, d.h. Wasser und das organische Lösungsmittel. Im Falle dieses Zweiphasen-Systems Wasser – organisches Lösungsmittel kann die das Enzym (oder das Enzym und den hydrophilen Stoff) enthaltende wässrige Phase von der die Substrate und das Lösungsmittel enthaltenden Phase des organischen Lösungsmittels getrennt

werden, indem man das System stehenlässt oder einer Zentrifugation, selektiven Filtration und dergleichen unterzieht. Diese im nachstehenden angewandten Termini haben dort dieselbe Bedeutung wie im vorstehenden.

Der hydrophile Stoff ist ein Stoff, der mit Wasser mischbar ist. Als dieser Stoff ist ein solcher von Vorteil, der das Enzym soweit möglich nicht inaktiviert, wie Glycerin. Das in der Phase des wasserhaltigen organischen Lösungsmittels zu verwendende organische Lösungsmittel ist vorteilhafterweise eines, das mit Wasser nicht mischbar ist und das Enzym soweit möglich nicht inaktiviert. Beispiele von verwendbaren organischen Lösungsmitteln sind Kohlenwasserstoff-Lösungsmittel wie n-Hexan, n-Heptan, n-Octan, Isooctan, Cyclohexan, n-Decan, n-Tridecan, n-Tetradecan, n-Hexadecan, Polybuten, Diisobutylen, flüssiges Paraffin, Squalan, Squalen, Pristan und dergleichen. Gleichwohl sind Mischungen von mindestens zwei dieser Kohlenwasserstoffe verwendbar, sowie Lösungsmittel, die solche Kohlenwasserstoffe enthalten, wie «IP Lösungsmittel 1016» (ein Produkt der Indemitsu Petrochemical Co., Ltd., welches eine Mischung des Isoparaffin-Typs ist und 63% einer C₈-Komponente sowie 30% einer C₉-Komponente enthält) und «ISOPAR E» (ein Produkt der Exxon Chemicals, welches eine Mischung des Isoparaffin-Typs ist und 25–35% einer C₈-Komponente sowie 75–60% einer C₉-Komponente enthält).

Im allgemeinen ist bei der Synthese von Glyceriden unter Verwendung eines Enzyms der Wassergehalt im Reaktionssystem ein sehr wichtiger Faktor. Um das Reaktionsgleichgewicht zur Synthese hin zu verlagern, ist es wesentlich nötig, die Menge Wasser weitestmöglich bis auf ein zur Entfaltung der Enzymaktivität erforderliches Minimum zu vermindern. Erfindungsgemäss läuft die Synthesereaktion günstig und schnell ab, auch wenn das Reaktionssystem eine grosse Menge Wasser enthält. Auch im System mit einem wasserhaltigen organischen Lösungsmittel läuft die Reaktion gleichmässig ab.

Insbesondere wenn für das vorgenannte System das Zweiphasen-System Wasser – organisches Lösungsmittel verwendet wird, enthält die resultierende Reaktionsmischung das Enzym in einer über die wässrige Phase oder über die Grenzschicht zwischen dem Wasser und dem organischen Lösungsmittel verteilten Form, und den gewünschten Ester sowie die nicht umgesetzten Substrate in einer über die Phase mit dem organischen Lösungsmittel verteilten Form. Folglich kann das Enzym leicht vom gewünschten Ester sowie von den nicht umgesetzten Substraten abgeschieden werden. Wenn zudem das organische Lösungsmittel verwendet wird, können Sterine und höhere aliphatische Alkohole, die als Feststoffe vorliegen, in einem im Lösungsmittel gelösten Zustand umgesetzt werden. Dies dient der Verbesserung der Eigenschaften der Reaktionsmischung, um den Kontakt zwischen dem Enzym und den Substraten auf vorteilhafte Weise herbeizuführen.

Die Reaktionsbedingungen brauchen nur solcher Art zu sein, dass die Inaktivierung des Enzyms vermieden oder auf ein Minimum herabgesetzt wird. Im allgemeinen werden ein optimales pH und eine für das Enzym optimale Temperatur verwendet. Diese Temperatur liegt im allgemeinen bei etwa 10 bis etwa 60°C. Wenn ein thermostabiles Enzym wie thermostabile Lipase verwendet wird, ist eine entsprechend höhere Temperatur verwendbar. Das zu verwendende pH entspricht der Art des verwendeten Enzyms. Wenn erforderlich ist das pH einstellbar, indem eine geeignete Säure oder ein geeignetes Alkali wie Salzsäure, Schwefelsäure, Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid, oder ein geeigneter Puffer wie Phosphatpuffer, dem Reaktionssystem beigegeben wird. Das Reaktionssystem kann ausserdem einen Enzymak-

tivator wie Casein, Albumin, Calciumion, Gallensäure oder ein Salz davon enthalten, sowie einen die Aktivität des Enzyms nicht inhibierenden grenzflächenaktiven Stoff wie «Tween 80» (ein Produkt der Kao Atlas Co., Ltd.) und «Triton X-100» (ein Produkt der Rohm & Haas), um den Kontakt zwischen den Substraten und dem Enzym wirksamer herbeizuführen.

Das Reaktionssystem enthält das Enzym und die Substrate in einem Verhältnis, das nicht spezifisch beschränkt ist, sondern auf geeignete Weise in Abhängigkeit von der Art dieser Stoffe, der Reaktionsbedingungen und der Verfahrensweise zum Ausüben des vorliegenden Verfahrens, d.h. chargenweise, kontinuierlich oder halbkontinuierlich (im Wiederholverfahren) bestimmt werden kann. Im allgemeinen kann man für eine einzelne Umsetzung etwa 1 bis etwa 1 Millionen Einheiten und besser etwa 500 Einheiten bis etwa 100 000 Einheiten von Lipase oder etwa 1 bis etwa 1 Million Einheiten und besser etwa 5 Einheiten bis etwa 100 000 Einheiten und am besten etwa 50 Einheiten bis etwa 50 000 Einheiten von Cholesterin-Esterase pro Gramm des alkoholischen Ausgangsstoffes [Komponente (1)] verwenden. Das Verhältnis zwischen der Komponente (1) und der Komponente (2) kann auf geeignete Weise ohne spezifische Beschränkung bestimmt werden, und es können die eine und die andere Komponente im Überschuss verwendet werden. Im allgemeinen wird das eine Substrat in einer Menge von etwa 0,1 bis etwa 20 Mol pro Mol des anderen Substrats verwendet.

Damit das Enzym eine Syntheseaktivität entfaltet, sind mindestens etwa 10 mg Wasser pro Gramm Enzym (Trockengewicht) nötig. Das Wasser ist im allgemeinen im Enzympräparat, im immobilisierten Träger oder in den Substraten enthalten. Im allgemeinen, wenn ein System mit einem wässrigen Medium als Reaktionssystem verwendet wird, bezieht sich der Wassergehalt des Systems, welcher zur Entfaltung der Aktivität des Enzyms erforderlich ist, auch auf den Zustand des Kontakts zwischen dem Enzym und den Substraten. Um einen zufriedenstellenden Kontakt herbeizuführen und eine genügende Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen, wird Wasser vorteilhafterweise in einem Gewicht von etwa 7 bis etwa 10 000 Mal und noch besser in einem Gewicht von etwa 15 bis etwa 700 Mal das Gewicht vom Enzym verwendet. Im Falle des Systems mit einem wasserhaltigen organischen Lösungsmittel liefert das Wasser, mit welchem das organische Lösungsmittel gesättigt ist, eine zur Entfaltung der Enzymaktivität genügende Menge Wasser. Wenn ein Fettsäure-Ester als eines der Substrate verwendet wird, findet anscheinend eine Hydrolyse des Esters vor der Synthesereaktion statt und das Wasser im System wird anscheinend teilweise zur Hydrolysereaktion verbraucht. Wenn die Menge Wasser entsprechend auf die Menge beschränkt wird, mit welcher das organische Lösungsmittel gesättigt ist, könnte sich daraus eine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit der Synthese ergeben. Es ist daher im allgemeinen von Vorteil, wenn das Reaktionssystem einen Wassergehalt aufweist, der die Löslichkeit im organischen Lösungsmittel übersteigt und als Zweiphasen-System Wasser – organisches Lösungsmittel dient. In einer Alternative ist es von Vorteil, ein immobilisiertes Enzym zu verwenden, das in seinem Immobilisierungsträger eine genügende Menge Wasser zurückhält. Damit wird eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit der Synthese und eine hohe Ausbeute herbeigeführt.

Wenn man ein Zweiphasen-System Wasser – organisches Lösungsmittel verwendet, das einen die Löslichkeit im organischen Lösungsmittel übersteigenden Wassergehalt aufweist, befindet sich das Enzym örtlich in der wässrigen Phase und an der Grenzfläche zwischen Wasser und Lösungsmittel,

so dass das Enzym von den Substraten zwecks Wiederverwendung getrennt werden kann, indem man die wässrige Phase vorteilhafterweise von der Phase mit dem organischen Lösungsmittel trennt.

Das Verhältnis vom Wasser zum Lösungsmittel im System mit dem Wasser enthaltenden organischen Lösungsmittel, und insbesondere die Menge von dem im System vorhandenen Wasser, beeinflussen die Reaktionsgeschwindigkeit einigermaßen. Es ist daher von Vorteil, die Menge Wasser in Abhängigkeit von der Art der zu verwendenden Substrate, der Art des Enzyms und des Lösungsmittels, der Verfahrensweise zum Mischen dieser Stoffe, der Form und Grösse des Reaktors, vom Gesamtvolumen des Reaktionssystems und von anderen Reaktionsbedingungen zu bestimmen. Wenn beispielsweise ein Sterin mit einer Fettsäure in einem System mit einem Wasser enthaltenden organischen Lösungsmittel unter Verwendung von Isooctan umzusetzen ist, ist es von Vorteil, Isooctan in einem Gewicht von etwa 0,001 bis etwa 100 Mal und noch besser in einem Gewicht von etwa 0,01 bis etwa 10 Mal das Gewicht vom Wasser zu verwenden. In diesem Falle wird das wasserhaltige organische Lösungsmittel vorteilhafterweise in einem Gewicht von etwa 5 bis etwa 500 Mal das Gewicht vom Sterin verwendet.

Obwohl das vorliegende Verfahren chargenweise durchgeführt werden kann, ist es von Vorteil, das Verfahren kontinuierlich oder halbkontinuierlich durchzuführen, weil das ziemlich teure Enzym dann mindestens zweimal nacheinander verwendet werden kann. Die Verfahren, bei denen das Enzym mindestens zweimal verwendet werden kann, können allgemein in zwei Typen eingeteilt werden: halbkontinuierliche Verfahren (Wiederholung des chargenweise durchgeführten Verfahrens) und kontinuierliche Verfahren, je nachdem, ob das Enzym oder das immobilisierte Enzym aus der Reaktionsmischung nach dem ersten Lauf der Kontaktreaktion abgeschieden wird. Die Verfahren jedes dieser Typen sind weiterhin wie folgt eingeteilt, je nachdem, ob immobilisiertes Enzym oder unverändertes Enzym verwendet wird.

Wenn das erfindungsgemässe Verfahren unter Verwendung von unverändertem Enzym entweder kontinuierlich oder halbkontinuierlich durchgeführt wird, verwendet man Phasentrennung, geeignete Filtrationsmittel oder Zentrifugation.

Wenn Phasentrennung zur kontinuierlichen Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens verwendet wird, umfasst die Verfahrensweise die Beigabe von Wasser und/oder von einem organischen Lösungsmittel zu der aus der ersten Reaktion resultierenden Reaktionsmischung, um die Mischung zu einem System mit zwei Phasen, d.h. eine wässrige Phase und eine hydrophobe Substratphase zu konvertieren (oder das Stehenlassen der unveränderten Mischung im Falle eines Zweiphasen-Systems Wasser – organisches Lösungsmittel), das Trennen der wässrigen Phase von der hydrophoben Substratphase durch Stehenlassen oder Zentrifugation, um das Enzym, das sich in der wässrigen Phase und an der Grenzfläche zwischen Wasser und Lösungsmittel befindet, von der den gewünschten Ester und die nicht umgesetzten Substrate enthaltenden organischen Phase zu trennen, und das wiederholte Verwenden des abgeschiedenen Enzyms. Die Beigabe des organischen Lösungsmittels zum System mit der wässrigen Phase zwecks Phasentrennung ist wirksam, um die Trennung durch Brechen der Emulsionsbildung in der Reaktionsmischung zu fördern. Die abgeschiedene organische Phase wird der Flüssig-Flüssig-Extraktion unter Verwendung eines Unterschieds im Verteilungskoeffizienten unterzogen, beispielsweise der Extraktion mit einer wässrigen Lösung eines Niederalkohols wie Methanol, wodurch das nicht umgesetzte Substrat wie hochpolares

Sterin oder höhere aliphatische verzweigte Alkohole in die wässrige Alkohollösung extrahiert wird und somit vom gewünschten Ester leicht und wirksam getrennt werden kann.

5 Wenn das Reaktionssystem ein System mit einem Wasser enthaltenden organischen Lösungsmittel, jedoch kein Zweiphasen-System Wasser – organisches Lösungsmittel ist, wird das in hydrophobe Substrate und organische Lösungsmittel unlösliche Enzym im Reaktionssystem in Form von Teilchen
10 suspendiert. Wenn man in diesem Falle die Filtration verwendet, kann folglich das Enzym mittels eines geeigneten Filtrationsverfahrens wie Mikrofiltration oder Ultrafiltration abgeschieden werden. Mikrofiltration kann unter Verwendung einer Kombination von gewöhnlichem Filterpapier
15 und einem Filtrationshilfsmittel durchgeführt werden. In diesem Falle wird das Enzym vom Agens in darauf adsorbierter Form gehalten und es ist unverändert verwendbar. Auch ein Membranfilter und dergleichen ist zur Mikrofiltration verwendbar. Vorteilhafterweise weist der Filter eine
20 Porengrösse von etwa 0,02 bis etwa 10 μm auf. Beispiele von für solche Filter verwendbaren Materialien sind anorganische Materialien mit einer hohen Widerstandsfähigkeit gegen Chemikalien, wie Glas und Metall, und organische Materialien wie regenerierte Cellulose, Teflon, Polypropylen, Polyamid, Polyimid und derartige Kunststoffe.

Wenn das Reaktionssystem ein System mit einem wässrigen Medium ist, verwendet man die Ultrafiltration, um das Enzym zur Wiederverwendung abzuscheiden. Ultrafiltration kann unter Verwendung von verschiedenen Ultrafilter
30 durchgeführt werden, die im allgemeinen im Handel erhältlich sind und aus chemisch widerstandsfähigen Materialien wie Polyamid, Polyimid, Hochpolymer-Elektrolyt-Verbundmaterialien usw. bestehen.

Weiterhin kann man im Falle eines Zweiphasen-Systems
35 Wasser – organisches Lösungsmittel die wässrige Phase vom öligen oder organischen Lösungsmittel durch Filtration unter Verwendung der selektiven Permeabilität von hydrophoben porösen Trennmembranen trennen. Präziser gesagt, hydrophobe Substrate und organische Lösungsmittel können
40 in Mikroporen der hydrophoben Trennmembran eindringen, während Wasser und Enzyme, die eine grössere Oberflächenspannung aufweisen, unfähig sind, die Oberfläche der Membran zu benetzen und durch die Mikroporen durchzutreten. Dies ermöglicht das Trennen des Enzyms vom Substrat und vom Reaktionsprodukt durch Filtration.
45 Die bei dieser Verfahrensweise zu verwendenden hydrophoben Trennmembranen sind solche, deren kritische Oberflächenspannung grösser ist als die der hydrophoben Stoffe und kleiner ist als die von Wasser, beispielsweise solche, deren kritische Oberflächenspannung etwa 0,030 bis etwa
50 0,055 N/m beträgt. Die Poren dieser Membranen brauchen nicht immer kleiner zu sein als die Enzymteilchen, sie können Grössen von bis zu etwa 10 μm aufweisen. Beispiele von verwendbaren Membranen sind handelsübliche Mikrofiltrations-Membranfilter, die aus hydrophobem Teflon und Polypropylen hergestellt sind.
55

Wenn die vorstehende Phasentrennung zur kontinuierlichen Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens verwendet wird, wird die kontinuierliche Verfahrensweise
60 durchgeführt, indem man beispielsweise ein unverändertes Enzym verwendet, das in Form einer wässrigen Lösung oder gelöst in eine wässrige Lösung eines hydrophilen Stoffes vorliegt, der mit dem vorgenannten System mit einem wässrigen Medium verwendbar ist (wenn im nachstehenden der Terminus «wässrige Lösung» für das Enzym verwendet wird, ist
65 dieser Terminus so zu verstehen, dass er die wässrige Lösung des hydrophilen Stoffes umfasst), und man verwendet einen geeigneten Reaktor, der eine Reaktionseinheit zum Bringen

in Kontakt und zum Umsetzen der wässrigen Enzymlösung mit den Substraten oder einer Lösung davon in einem organischen Lösungsmittel, und eine Trenneinheit zur Durchführung der Phasentrennung aufweist. Somit werden die Reaktion und die Phasentrennung kontinuierlich durchgeführt, um die wässrige Enzymlösung wiederholt zu verwenden, während man das gewünschte Produkt aus der abgeschiedenen organischen Phase kontinuierlich erhält. Eine ölige Phase oder eine Phase mit einem die Substrate enthaltenden organischen Lösungsmittel wird der Reaktionseinheit kontinuierlich zugeführt.

Der zur Durchführung der kontinuierlichen Verfahrensweise geeignete Reaktor kann einer von verschiedenen bekannten Reaktoren sein [vgl. Kagaku Kogaku (Chemical Engineering) III, herausgegeben von Tokyo Kagaku Dohjin, 1964]. Typische Beispiele von geeigneten Reaktoren sind vom Mischer-Ablagerer-Typ und vom Sprühturm-Typ.

Der Reaktor vom Mischer-Ablagerer-Typ umfasst die Kombination von einem Mischer und einem Ablagerer zur Trennung einer Mischung durch Schwerenunterschied. Zur Verwendung des Reaktors werden die Substrate oder eine Lösung davon in einem organischen Lösungsmittel kontinuierlich dem mit der wässrigen Enzymlösung gefüllten Mischer zugeführt, während die wässrige Enzymlösung im Mischer mit den Substraten oder einer Lösung davon unter gleichzeitigem Rühren in Kontakt gebracht und umgesetzt wird. Die Reaktionsmischung wird zum Ablagerer geleitet. Während sie im Ablagerer verweilt, wird die Reaktionsmischung in eine wässrige Phase und eine das gewünschte Produkt enthaltende Substratphase oder organische Phase getrennt (Reaktionsmischung). Während die enzymhaltige wässrige Phase zum Mischer zurückgeleitet wird, wird die Reaktionsmischung (Überstand) aus dem Abscheider abgezogen. Somit wird das Produkt kontinuierlich erhalten.

Zur Umsetzung nach der Verfahrensweise mit einem Sprühturm lässt man die wässrige Enzymlösung oder die Substrate oder deren Lösung in einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel im Innern des Turmes als dispergierte Phase aufsteigen oder absteigen. Es ist besonders von Vorteil, als dispergierte Phase die Substratphase zu verwenden, weil es dann nicht nötig ist, die Enzymphase zirkulieren zu lassen. Diese vorteilhafte Verfahrensweise wird durchgeführt, indem man die wässrige Enzymlösung in den Turm als kontinuierliche Phase eingibt, die Substratphase dem Turm über eine am unteren Teil des Turmes angeordnete Düse kontinuierlich zuführt, um die dispergierte Phase durch die Flüssigkeitssäule der Enzymlösung steigen zu lassen, damit deren Kontakt herbeigeführt und die ein Reaktionsprodukt enthaltende Phase von der kontinuierlichen Phase am oberen Teil des Turmes getrennt wird, und indem man die abgeschiedene Phase von der Spitze kontinuierlich oder in Abfolge abzieht. Im allgemeinen braucht die kontinuierliche Phase der in den Turm eingegebenen wässrigen Enzymlösung nicht ersetzt zu werden, bis die Aktivität des Enzyms abnimmt, während die Enzymlösung von Zeit zu Zeit mit frischen Schüben nachgefüllt werden kann, wenn die Aktivität des Enzyms abnimmt. Da die Reaktion im Turm an der Grenzfläche zwischen den aufsteigenden Tropfen der Substratphase und der wässrigen Enzymlösung stattfindet, sichert diese Verfahrensweise einen wirksamen Kontakt während der anfänglichen Etappe der Tropfenbildung und während die Tropfen zusammenwachsen, wie es bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion im allgemeinen der Fall ist. In dieser Hinsicht ist es von Vorteil, die Bildung und das Verschwinden der Tropfen viele Male zu wiederholen. Entsprechend ist die Zirkulation der Substratphase wirksam, um das Syntheseverhältnis des gewünschten Esters zu verbessern. Zudem kann die Reaktionsgeschwindigkeit verbessert

werden, indem man die Grösse der Tropfen vermindert, die Konzentration des Enzyms erhöht oder zur Erhöhung der Kontaktdauer die Aufstiegsgeschwindigkeit der Tropfen vermindert.

Die Sprühturm-Verfahrensweise kann wirksamer durchgeführt werden, indem man beispielsweise einen Turm verwendet, der gelochte Platten aufweist, die in Stufen auf Zwischenteilen des Turmes angeordnet sind. Die leichte dispergierte Substratphase tritt in der Form von Tropfen durch die Löcher der Platte der ersten Stufe hindurch und diese Tropfen fließen nach oben durch die kontinuierliche Phase der schweren Enzymlösung hindurch, während diese damit in Kontakt tritt und reagiert. Die Tropfen vereinigen sich zur Bildung einer flüssigen Phase unterhalb der gelochten Platte in der zweiten Stufe des Turmes, und die flüssige Phase wird dann beim Durchgang nach oben durch die zweite gelochte Platte wieder zu Tropfen verwandelt. Diese Verfahrensweise wird wiederholt. Entsprechend werden die Bildung und das Verschwinden der Tropfen innerhalb des mit den gelochten Platten versehenen Turmes mehrere Male wiederholt, um eine verbesserte Wirksamkeit zu erreichen.

Gleichwohl ist mit Vorteil ein Turm mit einer Mehrzahl von Blendenplatten im Flusskanal innerhalb des Turmes verwendbar, um die Kontaktdauer zwischen den beiden Phasen zu verlängern, wie auch ein Turm, der mit einem geeigneten Material anstelle der gelochten Platten oder Blendenplatten gepackt ist, ein Turm, der im Innern mit einem drehenden hohlzylindrischen oder scheibenförmigen Rührer zum Herbeiführen einer mechanischen Rührung versehen ist, ein Turm (Scheibel-Turm) mit wechselweise in Stufen angeordneten Packungsmaterial und Rührmittel, ein Pulsationsextraktor zum Herbeiführen einer Schüttelwirkung durch Pulsierung anstelle von mechanischer Rührung, ein Podbielniak-Extraktor, ein Luwesta-Extraktor und ähnliche Zentrifugalextraktoren, welche die mit Hochgeschwindigkeitsrotation erreichte Zentrifugalkraft verwenden. Diese Vorrichtungen können in Kombination verwendet werden.

Das erfindungsgemässe Verfahren umfasst ausserdem eine Verfahrensweise, bei welcher die hydrophile wässrige Enzymlösung auf der einen Seite einer porösen Reaktionsmembran und die hydrophoben Substrate oder eine Lösung davon in einem wasserhaltigen organischen Lösungsmittel auf der anderen Seite der Membran eingebracht werden, um die Enzymlösung durch die Mikroporen der Membran hindurch mit der Substratphase in Kontakt zu bringen und die Substrate umzusetzen. Mit dieser Verfahrensweise kann der gewünschte Ester hergestellt werden, und das Enzym ist ohne Vermischung der Enzymlösung mit den Substraten wiederholt verwendbar.

In diesem Falle wird das Enzym durch die Membran von den Substraten ohne Vermischung getrennt und durch die Mikroporen der Membran hindurch mit den Substraten in Kontakt gebracht, so dass die Reaktionsmischung kontinuierlich dem System entzogen werden kann, während die Substrate zur einen Seite der Membran kontinuierlich zugeführt werden. Diese Verfahrensweise verhindert daher die Emulgierung der Reaktionsmischung, den Eintritt des Enzymproteins in die Substratphase oder die Verminderung der Enzymaktivität durch die Substrate, sie befreit ausserdem die Reaktion von einer hinderlichen Wirkung vom Enzymstabilisator oder dergleichen, die der wässrigen Phase beigegeben werden. Weil die Reaktion zudem bei Raumtemperatur unter hermetischem Verschluss durchgeführt werden kann, werden beim Ablauf der Reaktion keine Nebenreaktionen wie Autooxidation des Substrats, Isomerisation oder Verschiebung der Doppelbindung miteinbezogen, auch wenn die Substrate eine niedrige Stabilität gegenüber der Oxidation aufweisen.

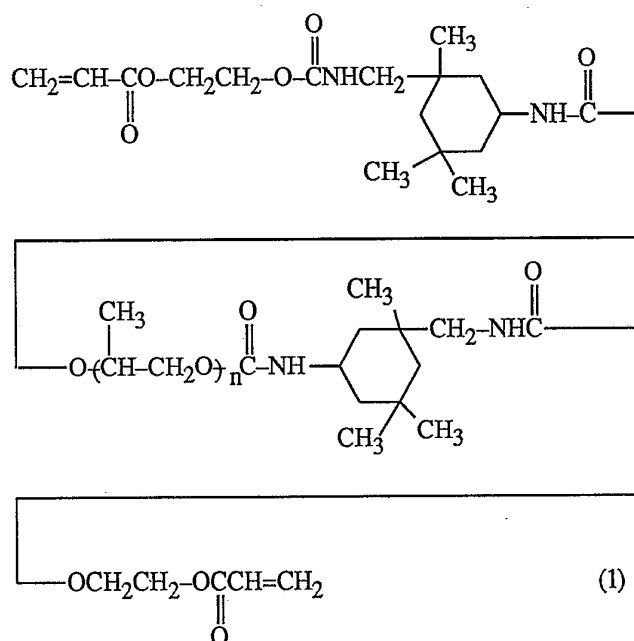
Das zur Verwendung bei der vorstehenden Verfahrensweise geeignete Material der porösen Reaktionsmembran ist nicht spezifisch beschränkt. Beispiele von verwendbaren Materialien sind anorganische Materialien wie Glas, Keramik, netzförmiger und poröser rostfreier Stahl, Kunstharze wie Teflon, Polypropylen, Polyethylen und ähnliche Polyolefinen, Cellulosederivate wie regenerierte Cellulose, Nitrocellulose und Acetylcellulose, und organische Materialien wie Nylon 66 und ähnliche Polyamide, Polycarbonate und dergleichen. Geeignet ist es, wenn die Membran im allgemeinen eine Porengrösse von etwa 0,05 µm bis etwa 10 µm aufweist. Typisch für solche Membranen sind handelsübliche Membranfilter für Mikrofiltration. Als solche Membranfilter wohl bekannt sind hydrophile Filter aus Acetylcellulose, Nitrocellulose, regenerierter Cellulose und dergleichen, und hydrophobe Filter aus Teflon, Polypropylen und dergleichen. Jedes dieser Filter ist erfindungsgemäss verwendbar. Als weitere Eigenschaften ist es von Vorteil, wenn die Reaktionsmembran eine Dicke von etwa 10 bis etwa 100 µm, besser von etwa 20 bis etwa 50 µm, und eine Porosität von 20 bis 80%, besser von etwa 40 bis etwa 60% aufweist. Die Membran ist in ihrer Form nicht spezifisch beschränkt, sie kann auf übliche Weise eben sein. Sie ist jedoch vorzugsweise hohlzylindrisch, spiralförmig, rohrförmig oder in der Form einer hohlen Faser. Wenn sie eine derartige Form aufweist, ermöglicht die Membran den Kontakt zwischen dem Enzym und den Substraten über eine grössere Fläche, als wenn sie eben ist, was die Reaktionsdauer verkürzt und ein verbessertes Syntheseverhältnis erreichen lässt.

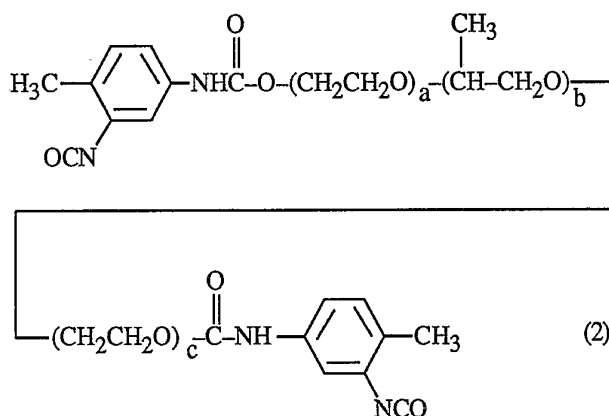
Wenn die Reaktionsmembran zur Durchführung des vorliegenden Verfahrens verwendet wird, kommt die wässrige Enzymlösung zur Umsetzung durch die Mikroporen der Membran hindurch mit den hydrophoben Substraten in Kontakt. Wenn die Membran hydrophob ist, dringen die hydrophoben Substrate durch die Mikroporen der Membran hindurch in die Enzymlösung hinein. Es ist daher von Vorteil, an der Enzymlösung Druck anzulegen, um diesen Nachteil zu vermeiden. Dieser Druck variiert in Abhängigkeit der Art des Membranmaterials. Die obere Grenze für den Druck ist im allgemeinen ein Wert, der dem Wasser erlaubt, durch die Mikroporen der Membran hindurch gegen den darauf von der Oberflächenspannung des Wassers verursachten

Widerstand durchzutreten, d.h. ein Wert, bei welchem Wasser durchsickert. Im allgemeinen liegt der Druck vorteilhafterweise im Bereich von etwa 0,001 bis etwa 20 Bar. Wenn die Membran hydrophil ist, ist es von Vorteil, einen Druck von etwa 0,001 bis etwa 20 Bar auf die Substratseite anzulegen, um zu verhindern, dass die wässrige Enzymlösung durch die Mikroporen der Membran hindurch in die Substratseite hinein eindringt. Die der einen Seite der Membran zugeführte wässrige Enzymlösung braucht im allgemeinen nicht ersetzt oder nachgefüllt zu werden, bis ihre Aktivität nachlässt, und die Lösung braucht nicht gerührt oder zirkuliert zu werden. Zur Umsetzung tritt die der anderen Seite der Membran zugeführte Substratphase mit dem Enzym durch die Mikroporen der Membran hindurch in Kontakt. Das Syntheseverhältnis steigt mit einer Verlängerung der Kontaktdauer. Das Syntheseverhältnis kann mit verkürzter Kontaktdauer verbessert werden, indem man die Kontaktfläche zwischen dem Enzym und den Substraten erhöht.

Die vorliegende Erfindung umfasst die Verwendung einer immobilisierten Lipase oder Cholesterol-Esterase zur Durchführung des Verfahrens. Das immobilisierte Enzym kann hergestellt werden, indem man einen geeigneten Träger nach verschiedenen bekannten Verfahrensweisen verwendet, beispielsweise nach der Verfahrensweise mit Einschliessen, kovalenter Bindung an anorganischem Träger, kovalenter Bindung an organischem Träger, Adsorption usw. Diese Verfahrensweisen werden nachstehend im einzelnen beschrieben.

Die Verfahrensweise mit Einschliessen kann unter Verwendung von verschiedenen bekannten Trägern durchgeführt werden. Da die zur vorliegenden Reaktion zu verwendenden Substrate hydrophob sind, sind solche Träger von Vorteil, die den Substraten erlauben, in Gele leicht einzudringen, und die einen grossen Verteilungskoeffizienten für hydrophobe Stoffe aufweisen. Beispiele von solchen Trägern sind hydrophobe photovernetzbare Harzvorpolymere wie ENTP gemäss der nachstehenden Formel (1) [cf. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 5, 325 (1979) und die ungeprüfte veröffentlichte japanische Patentanmeldung Sho-57-118792], und das Urethanvorpolymer PU gemäss der nachstehenden Formel (2) [cf. Biotechnol. Bioeng., 20, 1465-1469 (1978) und European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 8, 143-155 (1979)].





Die hydrophobe Eigenschaft dieser Harze kann auf gewünschte Weise geändert werden, indem man im Falle von ENTP-Harz den Gehalt des Moleküls an Propylenoxid, oder im Falle von PU-Harz den Gehalt an EO/PO variieren lässt.

Die Verfahrensweise mit Einschliessen kann unter Verwendung von ENTP oder ähnlichen vernetzbaren Harzvorpolymeren durchgeführt werden, beispielsweise indem man dem ENTP-4000 mit einer Kettenlänge von 40 nm ein Agens zur Schaffung von Photoempfindlichkeit beigibt, die Mischung auf etwa 60°C erwärmt, um eine Schmelze zu erhalten, die geschmolzene Mischung auf 4°C abkühlt, der Mischung ein Enzym in Pulverform oder in einer auf einem porösen anorganischen Träger wie Celit oder Siliciumdioxid adsorbierten Form beigibt (ein geeigneter grenzflächenaktiver Stoff oder dergleichen kann bei diesem Schritt auch beigegeben werden), die resultierende Mischung über ein durchsichtiges Glas oder einer Platte aus Polyester streicht, die gestrichene Mischung mit einer Kunststoffabdeckung deckt, um die Luft zu beseitigen, die Mischung mit chemischen Lampen während einigen Minuten bestrahlt (Wellenlängen im Bereich von 300–400 nm; maximale Intensität bei 360 nm), um die Gelierung herbeizuführen, und die resultierende Gelfolie mit dem immobilisierten Enzym in kleine Stücke zerschneidet, womit das gewünschte immobilisierte Enzym erhalten wird.

Die Verfahrensweise mit Einschliessen kann unter Verwendung von PU-Harzen durchgeführt werden, d.h. von in hohem Masse hydrophobem PU-3 (mittleres Molekulargewicht 2529, NCO-Gehalt 4,2%, Ethylenoxid-Gehalt 57%, vgl. die vorangehend genannten Literaturstellen), indem man das Harz auf etwa 50°C erwärmt, um es zu verflüssigen, das Harz auf 30°C abkühlt, dem Harz eine wässrige Enzymlösung beigibt, während es noch fließfähig ist, die Mischung während einiger Minuten knetet, bis die Gelierung anfängt, die Mischung auf 4°C während etwa 60 Minuten hält, um die Gelierung bis zur Vollständigkeit zu führen, den Gelblock auf eine geeignete Grösse schneidet, und das Produkt mit Wasser wäscht, um die nicht umgesetzten NCO-Reste zu entfernen, womit das gewünschte Enzympräparat erhalten wird. Wenn die Reaktionstemperatur 30°C überschreitet, kann das Enzym teilweise inaktiviert werden, so dass man für die Vermeidung dieses Nachteils sorgen muss.

Zur Durchführung der Verfahrensweise mit Bindung verwendbare anorganische oder organische Träger sind mit Vorteil mikroporöse Träger mit einer hydrophoben porösen Oberfläche. Im allgemeinen weisen die Poren einen mittleren Radius von etwa 1 nm bis etwa 100 nm auf. Solange die Poren dem Träger eine höhere Bindungsfläche pro Träger-
 60 teilchen verleihen, können die Poren beispielsweise solche eine längliche Form aufweisen, dass das Radius der Poren nicht bestimmt werden kann. Beispiele von vorteilhaften Trägern sind anorganische Träger, umfassend poröses Glas,

poröse Keramik, Celit, poröse metallhaltige Teilchen wie Titanoxid, Aluminiumoxid, poröses Silicagel, Molekularsieve, Aktivkohle, Ton, Kaolinit, Bentonit, Hydroxyapatit, Calciumphosphatgel und Alkylamin-Derivate dieser Stoffe, und organische Träger, umfassend mikroporöse adsorbierende Harze wie ein Harz auf Basis von Styrol oder Alkylamin-Pulver, Chelat-Harze, Ionenaustausch-Harze wie «Dowex MWA-1» (ein schwach basisches Anionenaustausch-Harz, das ein Produkt der Dow Chemical Co. ist, ein tertiäres Amin als Austausch-Rest aufweist und auf Basis von mit Divinylbenzol vernetzten Polystyrol-Ketten zusammengesetzt ist, mit einem mittleren Porenradius von 15 nm und einer einem Sieb von 0,83–0,29 mm lichter Maschenweite
 30 entsprechend Teilchengrösse), und hydrophile Cellulose-Harze wie ein durch Maskierung des hydrophilen Rests eines Trägers auf Cellulose-Basis hergestelltes Harz, beispielsweise «Cellulofine GC700-m» (ein Produkt der Chisso Corporation mit einer Teilchengrösse von 45–105 nm).

Die Verfahrensweise mit kovalenter Bindung kann zur Immobilisierung des Enzyms unter Verwendung von solchen anorganischen Trägern durchgeführt werden, beispielsweise indem man ein Alkylamin-Derivat vom anorganischen Träger herstellt, der porösen Oberfläche des Trägers verbesserte hydrophobe Eigenschaften verleiht, und das Enzym nach der Verfahrensweise mit Glutaraldehyd oder mit Carbodiimid immobilisiert [vgl. H. H. Weetall, Methods in Enzymology, 44, 134–148 (1976)].

Wenn als organischer Träger bei der Verfahrensweise mit kovalenter Bindung ein hydrophobes poröses Harz verwendet wird, kann das Verfahren durchgeführt werden, indem man das Enzym vom Harz absorbieren lässt und dann die Verfahrensweise mit Glutaraldehyd durchführt [vgl. Rev. Ferment. Ind. Alim., 11, 237 (1956)]. Insbesondere kann die
 50 Verfahrensweise mit kovalenter Bindung beispielsweise unter Verwendung von Dowex MWA-1 durchgeführt werden, indem man das Harz (1 g) mit destilliertem Wasser und 1/15 M McIlvaine-Puffer (pH 5,0) wäscht, 0,2 ml Enzymlösung (1500 IE) beigibt, die Mischung zur Herbeiführung der Adsorption über Nacht bei 8°C schüttelt, der Mischung 1 ml McIlvaine-Puffer und 80 µl einer 25%igen Glutaraldehyd-Lösung beigibt, die resultierende Mischung zur Bindung des Enzyms an das Harz während 10 Minuten bei 8°C schüttelt, 0,2 ml 20%iges Natriumbisulfid beigibt, die
 60 Mischung zur Entfernung eines Überschusses an Glutaraldehyd während 10 Minuten bei 80°C schüttelt, und die resultierende Mischung wäscht.

Wenn als organischer Träger ein hydrophiles Harz wie Cellulofine GC700-m verwendet wird, kann das Verfahren
 65 durchgeführt werden, indem man die auf der Oberfläche des Harzes vorhandenen hydrophilen Hydroxy-Reste epoxidiert, das epoxidierte Harz mit Ethylendiamin aminierte, das Harz mit Glutaraldehyd behandelt, um ein aldehydiertes Harz zu

erhalten, und das Harz mit dem Enzym in einem Phosphatpuffer umgesetzt.

Zur Verfahrensweise mit Adsorption verwendbare Träger sind organische Träger, die hergestellt werden, indem man hydrophile Polysaccharide wie Agarose-Gel mit einem Alkyl, Phenyl, Trityl oder ähnlichen hydrophoben Rest modifiziert, um eine hydrophobe poröse Oberfläche zu schaffen, beispielsweise «Octyl-Sepharose CL-4B», «Phenyl-Sepharose CL-4B» (beides Produkte der Pharmacia Fine Chemicals) und Trityl-Agarose-Gel, anorganische Träger, welche die gleichen Träger umfassen wie in der vorangehenden Beispielsangabe zur Verfahrensweise mit kovalenter Bindung. Die hydrophobe Eigenschaft der vorstehend genannten organischen Träger kann erhöht werden, indem man die Menge der nicht-polaren hydrophoben Alkyl-Reste erhöht oder die Hydroxyl-Reste und ähnliche Reste mit einem Alkyl-Rest oder dergleichen modifiziert.

Bei der Verwendung von solchen organischen Trägern kann die Verfahrensweise mit Adsorption durchgeführt werden, indem man beispielsweise den Träger gründlich mit Phosphatpuffer oder dergleichen wäscht und dann den Träger und die wässrige Enzymlösung zusammen schüttelt, um die Adsorption des Enzyms am Träger herbeizuführen. Diese Verfahrensweise ergibt eine hohe Ausbeute der Immobilisierung im Vergleich zur Verfahrensweise mit kovalenter Bindung. Zudem hält und liefert der Träger, der ein hydrophiles Gel mit daran gebundenen hydrophoben Liganden umfasst, eine zur Entfaltung der Aktivität des Enzyms benötigte genügende Menge Wasser. Durch Modifikation des hydrophoben Rests erhält der Träger zudem eine erhöhte Affinität für das hydrophobe Substrat. Entsprechend ist das nach dieser Verfahrensweise hergestellte immobilisierte Enzym für das vorliegende Verfahren besonders geeignet.

Wenn bei der Verfahrensweise mit Adsorption ein anorganischer Träger verwendet wird, kann das Verfahren durchgeführt werden, indem man bloss den Träger und die wässrige Enzymlösung zusammen schüttelt. Diese Verfahrensweise ist besonders bequem und billig, die Wahrscheinlichkeit ist geringer, dass die Aktivität des Enzyms bei der Immobilisierung vermindert wird, und physikalisch sowie chemisch stabil.

Wenn das erfindungsgemäße Verfahren unter Verwendung des nach einer der vorangehenden Verfahrensweisen immobilisierten Enzyms chargenweise oder halbkontinuierlich durchgeführt wird, werden das immobilisierte Enzym und die Substrate beispielsweise in einen geeigneten Reaktor eingegeben, um die Substrate umzusetzen, die mit dem Enzym in einem System mit einem wässrigen Medium und/oder in einem System mit einem organischen Lösungsmittel in Kontakt sind. Im Falle der halbkontinuierlichen Verfahrensweise wird das immobilisierte Enzym von der resultierenden Reaktionsmischung auf übliche Weise getrennt, beispielsweise durch Filtration oder Zentrifugation, und es wird bei aufeinanderfolgenden Reaktionszyklen wiederholt verwendet. Die Reaktion kann unter geeigneten Bedingungen durchgeführt werden, welche das immobilisierte Enzym nicht zerstören, beispielsweise unter Schütteln oder Führen der Substratlösung durch das Enzym zur Herbeiführung des Kontakts. Der gewünschte Ester kann aus der vom immobilisierten Enzym getrennten Reaktionsmischung auf gleiche Weise gesammelt werden wie in den vorangehenden Verfahrensweisen unter Verwendung der Phasentrennung.

Das vorliegende Verfahren kann unter Verwendung des immobilisierten Enzyms kontinuierlich durchgeführt werden, beispielsweise indem man das Enzym in eine geeignete Kolonne packt, die Substrate oder eine Lösung davon in einem wasserhaltigen organischen Lösungsmittel kontinuierlich durch die Kolonne führt, um den Kontakt und die

Reaktion herbeizuführen, die Reaktionsmischung kontinuierlich sammelt und den gewünschten Ester von der Reaktionsmischung trennt. Ob man nun die halbkontinuierliche oder die kontinuierliche Verfahrensweise verwendet, kann man gleichwohl das immobilisierte Enzym leicht gewinnen. Dies beseitigt die Notwendigkeit, das Protein des Enzyms beim Verfahrensschritt der Reinigung des gewünschten Esters zu entfernen, sichert die Wiederverwendung des gewonnenen Enzyms, und ist daher vorteilhaft. Zudem vermindert die kontinuierliche Verfahrensweise die Wahrscheinlichkeit, die Substrate während der Umsetzung der Luft auszusetzen, was den Vorteil hat, dass gegebenenfalls verwendete ungesättigte Fettsäuren und dergleichen nicht von der Luft oxidiert werden.

Der im vorliegenden Verfahren erhaltene gewünschte Ester wird von der Reaktionsmischung nach einer üblichen Verfahrensweise getrennt und wenn erforderlich gereinigt. Im Falle der chargenweisen Verfahrensweise kann das gewünschte Produkt von der Reaktionsmischung getrennt werden, indem man beispielsweise die Mischung unter Verwendung eines geeigneten Lösungsmittels wie Ether der Extraktion unterzieht, die nicht umgesetzten Fettsäuren mit einem Alkali entfernt, die Lösungsschicht entwässert und trocknet, und das Lösungsmittel von der Schicht entfernt. Das gewünschte Produkt kann beispielsweise mittels Kolonnen-Chromatographie gereinigt werden.

Der so erhaltene gewünschte Ester ist bei einer breiten Vielfalt von Anwendungen verwendbar, bei denen üblicherweise Ester der gleichen Art verwendet werden.

Beispiele

Die nachstehend gegebenen Beispiele dienen der weiteren Beschreibung der Erfindung. Es ist zu verstehen, dass die in den Beispielen angegebenen Mengen von Enzymen in Internationalen Einheiten angegeben werden, die gemäß den nachstehenden Verfahren bestimmt werden.

Aktivität von Lipase

75 ml einer Lösung von Polyvinylalkohol (wofür 18 g Poval-117 und 2 g Poval-205, beides Produkte der Kurashiki Rayon Co., Ltd., in 800 ml Wasser suspendiert, bei 75–80°C bis zur vollständigen Lösung gerührt, gekühlt, und durch Beigabe von Wasser auf ein Total von 1000 ml gebracht werden) werden 22,9 Olivenöl beigegeben und die Mischung wird mit einem Homogenisator emulgiert. 5 ml der so erhaltenen Emulsion werden 4 ml 0,1 M Phosphatpuffer und danach 1 ml einer Enzymlösung beigegeben. Die Mischung wird mit einem magnetischen Rührer bei 500 Umdrehungen pro Minute und bei 37°C während 20 Minuten gerührt. Nachdem 40 ml Ethylalkohol beigegeben werden, wird die freie Fettsäure mit 0,05 M Kaliumhydroxid titriert. Die Menge Enzym, die unter den vorgenannten Bedingungen 1 µMol-Äquivalent der Fettsäure in 1 Minute freisetzt, wird als 1 Internationale Einheit (IE) betrachtet.

Aktivität von Cholesterin-Esterase

Eine Internationale Einheit (1 IE) Cholesterin-Esterase ist die Aktivität, die aus Kalbsserum 1 µMol Cholesterins bei 37°C in 1 Minute freisetzt. Sie wird durch Oxidation des freien Cholesterins mittels Cholesterin-Oxidase bestimmt, indem man die nachfolgenden Reagens- und Enzymlösungen verwendet und das erzeugte Wasserstoffperoxid unter Verwendung von Peroxidase kolorimetrisch schätzt.

Zusammensetzung des Reagens:

0,2 M Phosphatpuffer	0,6 ml
Peroxidase (Sigma Chemical, Typ II Nr. P-8250)	0,3 ml
4-Aminoantipyrin (0,35%ige wässrige Lösung)	0,3 ml

Phenol (0,2 Gew.%ige wässrige Lösung)	0,3 ml
Cholesterin-Oxidase	0,6 ml
[hergestellt durch Dilution des Produkts Nr. T-04 (Toyo Jozo Co.) mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0; 0,05 Gew.% Triton X-100 enthaltend) auf 10 IE/ml]	
Kalbsserum	0,3 ml
Destilliertes Wasser	0,3 ml

Die Enzym-Probenlösung wird hergestellt, indem man das Enzym in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,5; 0,1% Albumin enthaltend) löst, um eine Konzentration von etwa 1 IE/ml zu erreichen. Ein Anteil von 3 ml der vorgenannten Reagens-Zusammensetzung wird in eine Kolorimetrie-Zelle eingegeben und während 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach werden 0,05 ml der Enzym-Probenlösung beigegeben. Das Mischen erfolgt durch vorsichtiges Umkippen der Zelle. Die optische Absorption wird in vorbestimmten Zeitabständen bei 493 nm gemessen, um auf diese Weise die Wachstumsrate der optischen Absorption ($\Delta A/\text{min}$) zu bestimmen. Wenn die Differenz zwischen den vorgenannten Wachstumsraten der optischen Absorption ($\Delta A/\text{min} = \Delta A_s - \Delta A_b$) unterhalb von 0,05 liegt, wird die Konzentration der Enzym-Probenlösung erhöht und die Prozedur wiederholt, bis die genannte Differenz 0,05 oder mehr beträgt. Die Enzymaktivität wird wie folgt berechnet:

Enzymaktivität (IE/mg) =

$$\frac{\Delta A/\text{min}}{12,0 \times 0,5} \times \frac{3,05}{0,05} \times \frac{1}{\text{Enzymkonzentration (mg/ml)}}$$

Das Syntheseverhältnis des gewünschten Esters wird auf folgende Weise bestimmt. In den Beispielen 1–14 wird die Reaktionsmischung angesäuert und viermal mit Diethylether extrahiert, der Extrakt wird mit Wasser gewaschen, entwässert und getrocknet, dann wird der Diethylether wegdestilliert, und dem gesamten so erhaltenen Lipid wird eine bekannte Menge von einem internen Normstoff (n-Dotriacontan) beigegeben, um eine Probe für die quantitative Bestimmung zu ergeben. Diese Probe wurde auf ein Chromarod (ein Quarzstab mit daran angeschmolzenem Silicagel; ein Produkt der Iatron; Chromarod S II) geladen, entwickelt und in einem Iatroscan TH-10 (ein Wasserstoff-Flammenionisations-Detektor; ein FID-Produkt der Iatron) gemessen. Die so bestimmte Menge des synthetisierten Esters wird durch die auf Basis der geladenen Menge berechnete theoretische Menge des Esters dividiert, um das prozentuale Syntheseverhältnis zu erhalten. In den Beispielen 15–65 wird die Reaktionsmischung zu einem Zweiphasen-System Wasser-organisches Lösungsmittel konvertiert, das organische Lösungsmittel wird abgeschieden, nach Einstellung auf eine geeignete Konzentration in einer 10–30 µg Lipid entsprechenden Menge auf das vorangehend genannte Chromarod geladen und schliesslich unter geeigneten Bedingungen entwickelt, womit eine Trennung des gewünschten Esters von den nicht umgesetzten Substraten (beispielsweise Hexan/Ether/Ameisensäure = 56/14/0,3) erreicht wird. Nötigenfalls wird zur Trennung der Komponenten beispielsweise ein mit Silbernitrat imprägniertes Chromarod verwendet. Nach der Entwicklung wird das Chromarod einige Minuten lang getrocknet und dann in einem von Entwicklungs-Lösungsmitteln freien Zustand im Iatroscan TH-10 gemessen, um die den Lipid-Komponenten in der Reaktionsmischung entsprechende Peak-Fläche zu bestimmen. Das Syntheseverhältnis des gewünschten Esters wird auf Basis der vorangehend genannten Fläche unter Verwendung der im entsprechenden Beispiel angegebene Gleichung berechnet.

Sofern nichts anderes angegeben wird, wurde die Reaktion in jedem der Beispiele in einem auf einer konstanten Temperatur von 37°C gehaltenen Raum durchgeführt, das Rühren der Reaktionsmischung erfolgte mittels eines Hin-und-Her-Schüttlers (20 mm × 300 Perioden pro Minute; ein Produkt der Iwashiyama Bio-Science Co., Ltd.; Typ RMR-S-20), und die organischen Lösungsmittel wurden in einem mit Wasser gesättigten Zustand verwendet.

In den Beispielen 1–8 wurde als Enzym eine von *Candida cylindracea* abgeleitete Lipase verwendet («Lipase MY»; ein Produkt der Meito Sangyo Co., Ltd.). Die in anderen Beispielen verwendeten Enzyme werden in den betreffenden Beispielen angegeben.

Beispiel 1

In diesem Beispiel wurde die Korrelation zwischen der Syntheserate des Esters (Syntheseverhältnis) und dem quantitativen Verhältnis zwischen den Substraten untersucht, indem man die Reaktion in verschiedenen Läufen durchgeführt hat, bei welchen jeweils 100 mg Cholesterin und verschiedene Mengen Ölsäure als Sterin beziehungsweise Fettsäure verwendet und in Gegenwart von 0,5 ml (500 IE) einer wässrigen Lipaselösung unter Rührung während 18 Stunden miteinander in Kontakt gebracht wurden. Die so erhaltenen Resultate sind in der nachstehenden Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1

30 Lauf Nr.	Menge Ölsäure (mg)	Syntheseverhältnis (%)
1	70	58,5
2	100	77,9
3	150	83,0
35 4	220	87,7
5	290	88,6
6	370	89,7
7	440	91,8
40 8	660	92,0

Die Daten der Tabelle 1 zeigen, dass wenn Ölsäure in einer Menge von 1–6 Mal das Gewicht vom Cholesterin verwendet wird, der gewünschte Ester, Cholesterin-Oleat, in einem Verhältnis von nicht weniger als 80% synthetisiert werden kann. Sie zeigen auch noch, dass wenn Ölsäure in einer Menge von 2–6 Gewichtsteilen (3–9 Mol) pro Gewichtsteil (Mol) Cholesterin verwendet wird, die Veresterung schnell abläuft und das Syntheseverhältnis des gewünschten Esters ein Maximum erreicht.

Beispiel 2

In diesem Beispiel wurde untersucht, was für einen Einfluss der Wassergehalt im Reaktionssystem auf das Syntheseverhältnis des gewünschten Esters ausübt. Daher wurde die Reaktion unter Verwendung von 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure und 0,5 ml (500 IE) einer wässrigen Lipaselösung unter den gleichen Bedingungen wie im Beispiel 1 durchgeführt, ausser dass dem System 0,5 ml, 1,0 ml, 2,0 ml, 4,0 ml, 6,0 ml oder 10,0 ml Wasser beigegeben wurden. Die Werte des in den verschiedenen Läufen erreichten Syntheseverhältnisses (nach 18 Stunden) sind in der nachstehenden Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2

Lauf Nr.	Menge Wasser (ml)	Syntheseverhältnis (%)
1	0	87,5
2	0,5	97,6
3	1,0	97,4
4	2,0	98,2
5	4,0	97,4
6	6,0	96,9
7	10,0	92,7

Die Daten der Tabelle 2 zeigen, dass Wasser mit Vorteil in einer Menge von 1–3 ml (etwa 10–30 Gewichtsteile pro Gewichtsteil Cholesterin) verwendet wird.

Beispiel 3

In diesem Beispiel wurde die Reaktion in Systemen mit einem Wasser enthaltendem organischen Lösungsmittel durchgeführt. Daher wurde die Reaktion unter Verwendung von 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure, 0,5 ml (500 IE) einer wässrigen Lipaselösung und verschiedenen Mengen von jeweils mit Wasser gesättigtem Isooctan, n-Octan oder n-Hexan unter Rührung während 18 Stunden durchgeführt. Die auf diese Weise erreichten Werte des Syntheseverhältnisses des Esters sind in der nachstehenden Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3

Lauf Nr.	Menge Wasser (ml) Wasser (ohne organische Lösungsmittel)	Syntheseverhältnis (%)
1		87,5
2	Isooctan (1)	96,2
3	(2)	96,7
4	(4)	91,4
5	(6)	83,4
6	(8)	78,8
7	(10)	67,6
8	n-Octan (1)	83,5
9	(2)	78,1
10	(4)	29,8
11	(6)	13,9
12	(8)	8,5
13	(10)	7,7
14	Isooctan (1)	76,4
15	(2)	68,8
16	(4)	29,6
17	(6)	11,0
18	(8)	9,5
19	(10)	6,6

Die Daten der Tabelle 3 zeigen, dass unter den vorangehenden Systemen die Systeme mit Isooctan das Enzym am wenigsten inaktivieren. Wenn Isooctan in einer Menge von 0,5–3 ml verwendet wird, wird das Syntheseverhältnis des Esters stark erhöht.

Beispiel 4

In diesem Beispiel wurde die Reaktion während 18 Stunden im System mit Wasser und Isooctan durchgeführt,

indem einer Mischung von 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure und 0,5 ml (500 IE) einer wässrigen Lipaselösung 2,0 ml Isooctan und zudem verschiedene Mengen Wasser beigegeben wurden. Die auf diese Weise erreichten Werte des Syntheseverhältnisses des gewünschten Esters sind in der nachstehenden Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4

Lauf Nr.	Menge Wasser (ml)	Syntheseverhältnis (%)
1	0 (keine Beigabe)	73,0
2	1	92,7
3	2	94,6
4	4	96,6
5	6	96,8
6	7	96,5
7	8	97,5
8	9	94,9
9	10	95,5

Beispiel 5

In diesem Beispiel wurde die Reaktion auf gleiche Weise und unter den gleichen Bedingungen wie im Beispiel 4 durchgeführt, ausser dass die Menge im System mit Wasser und Isooctan konstant gleich 2,0 ml blieb, während die Menge Isooctan variiert wurde und Änderungen im Wert des Syntheseverhältnisses des gewünschten Esters untersucht wurden. Die erhaltenen Resultate sind in der nachstehenden Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5

Lauf Nr.	Menge Wasser (ml)	Syntheseverhältnis (%)
1	0 (keine Beigabe)	87,9
2	0,5	94,9
3	1,0	95,1
4	1,5	96,4
5	3,0	94,0
6	4,0	90,4
7	6,0	83,4
8	8,0	71,5

Die Daten der Tabelle 5 zeigen, dass die kombinierte Verwendung von 2 ml Wasser und 0,5–3,0 ml Isooctan (5–30 Mal mehr als die Menge Sterin) das Syntheseverhältnis des Esters stark erhöht.

Beispiel 6

In diesem Beispiel war die Fettsäure ein Feststoff und es wurden die Reaktionen im Wasser enthaltenden organischen Lösungsmittel und in Wasser verglichen. Die Reaktion wurde unter Verwendung von 100 mg Cholesterin, 220 mg einer Fettsäure in Form von Feststoff und 0,5 ml (500 IE) einer wässrigen Lipaselösung unter Rührung während 18 Stunden durchgeführt. Zum Durchführen der Reaktion im Zweiphasen-System Wasser – organisches Lösungsmittel wurden dem Reaktionssystem ausserdem 2,0 ml n-Octan und 7,5 ml Wasser beigegeben, während dem Reaktionssystem zum Durchführen der Reaktion im System mit wässrigem Medium 2,0 ml Wasser beigegeben wurden. Als Fettsäure in Form von Feststoff wurden jeweils Palmitinsäure und Stearinsäure verwendet. Die auf diese Weise erreichten Werte

sind in der nachstehenden Tabelle 6 aufgeführt. Zum Vergleich werden auch die unter Verwendung von der bei Raumtemperatur flüssigen Ölsäure erhaltenen Werte in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6

Lauf Nr.	Fettsäure	Syntheseverhältnis (%)	
		Zweiphasen-System Wasser – organisches Lösungsmittel	wässriges System
1	Palmitinsäure	99,0	91,6
2	Stearinsäure	98,5	51,6
3	Ölsäure	96,5	91,6

Die Daten der Tabelle 6 zeigen, dass die Verwendung vom Zweiphasen-System Wasser – organisches Lösungsmittel das Syntheseverhältnis besonders stark erhöht, wenn die Säure Stearinsäure ist.

Beispiel 7

In diesem Beispiel wurden dem 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure, 2,0 ml n-Octan und 8,0 ml Wasser enthaltenden System 0,5 ml einer Lipaselösung von variabler Konzentration beigegeben, und es wurde die Korrelation zwischen der Enzymkonzentration und der Syntheserate des Esters untersucht. Die Reaktion wurde unter Rührung während 18 Stunden durchgeführt. Die so erhaltenen Resultate sind in Fig. 1 dargestellt. In Fig. 1 ist das Syntheseverhältnis des Esters (%) auf der Ordinate und die Menge Enzym (in Internationalen Einheiten, IE) auf der Abszisse eingetragen, wobei das Verhältnis des unter Verwendung von verschiedenen Mengen Enzym (in IE angegeben) erhaltenen Esters in Abhängigkeit von diesen Mengen Enzym dargestellt ist.

Die Daten der Fig. 1 zeigen, dass die Reaktion bei Verwendung von etwa 5000 IE Enzym pro 1000 mg Cholesterin schnell ablaufen kann und den gewünschten Ester mit hohen Ausbeuten ergibt.

Beispiel 8

In diesem Beispiel wurde Lipase in derjenigen Menge (etwa 100 IE) verwendet, von der im Beispiel 7 gefunden wurde, dass sie ein Syntheseverhältnis von etwa 30–40% nach 18 Stunden Reaktionsablauf ergibt, und die enzymatische Reaktion wurde dann noch weitergeführt. Auf diese Weise wurde die Korrelation zwischen der Reaktionsdauer und dem Syntheseverhältnis des Esters untersucht. Die so erhaltenen Resultate sind in der nachstehenden Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7

Lauf Nr.	Reaktionsdauer (h)	Syntheseverhältnis (%)
1	16	45,6
2	24	57,7
3	40	65,8
4	48	70,0
5	64	74,4
6	72	74,9
7	96	78,0
8	120	79,8

Die Daten der Tabelle 7 zeigen, dass auch wenn die Menge Enzym etwa 100 IE beträgt, eine Verlängerung der Reaktionsdauer auf 120 Stunden eine Herstellung des gewünschten Esters mit einem Syntheseverhältnis von etwa 80% ergeben kann.

Beispiel 9

In diesem Beispiel wurde jede in Tabelle 8 angegebene Kombination eines Sterins (in einer Menge von 100 mg) mit einer Fettsäure und einem Enzym (in einer Menge von 0,5 ml Lösung) verwendet, und die Reaktion wurde in jedem in Tabelle 8 angegebenen Reaktionssystem unter Rührung während 18 Stunden durchgeführt, um den entsprechenden gewünschten Ester zu ergeben. Die so erhaltenen Daten sind ebenfalls in der nachstehenden Tabelle 8 aufgeführt.

Die in Tabelle 8 und in den nachfolgenden Tabellen für Sterine, Fettsäuren, Enzyme und organische Lösungsmittel verwendeten Symbole bedeuten folgendes:

20 Sterine

- A-1 Cholesterin
- A-2 β -Sitosterin
- A-3 Stigmasterin
- A-4 β -Cholestanin
- 25 A-5 Ergosterin
- A-6 Isocholesterin
- A-7 Isotridecylalkohol (ein Produkt der Kuraray Co., Ltd.)
- A-8 NJCOL 200A (ein Produkt der New Japan Chemical Co., Ltd.)
- 30 A-9 Lanolinalkohol HH (ein Produkt der Yoshikawa Oil and Fat Co., Ltd.)
- A-10 Fine Oxocol 1800 (ein Produkt der Nissan Chemical Industries, Ltd.)

35

Fettsäuren

- B-1 Ölsäure
- B-2 Palmitinsäure
- B-3 Stearinsäure
- 40 B-4 Linolsäure
- B-5 α -Hydroxypalmitinsäure
- B-6 Lanolin-Fettsäuren (ein Produkt der Yoshikawa Oil and Fat Co., Ltd.)
- B-7 Propionsäure
- 45 B-8 Caprinsäure
- B-9 Lignocerinsäure
- B-10 Bernsteinsäure
- B-11 Sebacinsäure
- B-12 Isostearinsäure (ein Produkt der Emery Industries Inc.)
- 50 B-13 PA1P (Fettsäure aus Tallöl, Hauptkomponenten sind Ölsäure und Linolsäure, ein Produkt der Harima Chemicals, Inc.)
- B-14 Linolensäure (ein Produkt der Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.)
- 55

Enzyme

- E-1 Lipase MY (von Candida cylindracea abgeleitete Lipase; 30 IE/mg; ein Produkt der Meito Sangyo)
- 60 E-2 Lipase T-01 (von Chromobacterium viscosum abgeleitete Lipase; 280 IE/mg; ein Produkt der Toyo Jozo)
- E-3 Lipase «Amano» (von der Species Aspergillus abgeleitete Lipase; 4 IE/mg; ein Produkt der Amano Pharmaceutical Co., Ltd.)
- 65 E-4 Cholesterin-Esterase (von der Species Pseudomonas abgeleitete Esterase; 100 IE/mg; ein Produkt der Funakoshi Yakuhin)

E-5	Cholesterin-Esterase T-01 (105 IE/mg; ein Produkt der Toyo Jozo)	Organische Lösungsmittel
E-6	Cholesterin-Esterase (von <i>Candida cylindracea</i> abgeleitete Esterase; 20 IE/mg Protein; ein Produkt der Seikagaku Kogyo)	S-1 n-Octan
E-7	Lipase D-10 (von <i>Rhizopus delemere</i> abgeleitete Lipase; 10 IE/mg; ein Produkt der Amano Seiyaku)	S-2 Isooctan
E-8	Lipase (von <i>Rhizopus delemere</i> abgeleitete Lipase; 600 IE/mg; ein Produkt der Seikagaku Kogyo Co., Ltd.)	S-3 Cyclohexan
E-9	Cholesterin-Esterase (von der Milz abgeleitete Esterase; 11 IE/mg; ein Produkt der Oriental Yeast Co., Ltd.)	5 S-4 n-Hexadecan
		S-5 «IP Lösungsmittel 1016» (Mischung von isoparaffinischen organischen Lösungsmitteln mit einem C ₈ -Gehalt von 63% und einem C ₉ -Gehalt von 30%; ein Produkt der Idemitsu Petrochemical)
		10 S-6 «Isopar E» (Mischung von isoparaffinischen organischen Lösungsmitteln mit einem C ₈ -Gehalt von 63% und einem C ₉ -Gehalt von 30%; ein Produkt der Exxon Chemicals)

Tabelle 8

Lauf Nr.	Enzym (IE)	Sterin	Fettsäure (Mol bezogen auf Sterin)	Wasser (ml)	Organisches Lösungsmittel (ml)	Syntheseverhältnis (%)
1	E-1 (500)	A-1	B-1 (3)	8	S-1 (2)	96,5
2	E-1 (500)	A-2	B-1 (3)	8	S-1 (2)	95,5
3	E-1 (500)	A-3	B-1 (3)	8	S-1 (2)	69,0
4	E-1 (500)	A-4	B-1 (3)	8	S-1 (2)	92,8
5	E-1 (500)	A-5	B-1 (3)	8	S-1 (2)	55,0
6	E-1 (500)	A-6	B-1 (1,4)	0	S-2 (4,3)	70,4
7	E-1 (500)	A-1	B-1 (3)	8	S-1 (2)	96,5
8	E-1 (500)	A-1	B-2 (3)	8	S-1 (2)	99,0
9	E-1 (500)	A-1	B-3 (3)	8	S-1 (2)	98,5
10	E-1 (500)	A-1	B-4 (3)	8	S-1 (2)	96,5
11	E-1 (500)	A-1	B-5 (3)	8	S-1 (2)	35,0
12	E-2 (1000)	A-1	B-6 (3)	2	- (0)	55,0
13	E-2 (1000)	A-1	B-1 (3)	8	S-2 (2)	85,3
14	E-3 (1000)	A-1	B-1 (3)	2	S-2 (0,5)	55,2
15	E-4 (50)	A-1	B-1 (3)	8	S-2 (2)	96,9
16	E-5 (500)	A-1	B-1 (3)	8	S-1 (2)	97,7
17	E-5 (500)	A-2	B-1 (3)	8	S-1 (2)	88,3
18	E-6 (500)	A-1	B-1 (3)	8	S-2 (2)	95,0
19	E-3 (1000)	A-6	B-1 (3)	8	S-2 (2)	63,0
20	E-1 (1000)	A-4	B-3 (3)	8	S-2 (2)	99,2

Beispiel 10

Die Veresterung wurde während einer in Tabelle 9 angegebenen Zeitdauer in einem Reaktionssystem durchgeführt, das aus Cholesterin (100 mg), einer in Tabelle 9 angegebenen Fettsäure (in einer Menge von 3 Mol pro Mol Sterin), einem in Tabelle 9 angegebenen Enzym (1000 IE) und einem Zweiphasen-System Wasser – organisches Lösungsmittel [3 ml Isooctan + 7 ml 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7)] bestand. Die für jeden gewünschten Ester so erhaltenen Werte der Syntheseverhältnisse sind ebenfalls in der Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9

Lauf Nr.	Enzym	Fettsäure	Reaktionsdauer (h)	Syntheseverhältnis (%)
1	E-1	B-7	48	65,4
2	E-1	B-8	18	94,3
3	E-1	B-6	48	85,5
4	E-1	B-5	72	72,7
5	E-2	B-6	120	74,1
6	E-2	B-8	120	89,4
7	E-2	B-9	72	77,0
8	E-2	B-11	120	42,4
9	E-3	B-10	120	27,0
10	E-3	B-8	120	55,8

Beispiel 11

Die Reaktion wurde unter Verwendung von 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure, 1000 IE Lipase MY und 2 ml Isooctan + 8 ml 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7) durchgeführt, und es wurden die Änderungen des Syntheseverhältnisses in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10

Reaktionsdauer (h)	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0
Syntheseverhältnis (%)	83,7	94,0	97,5	98,0	98,4	98,5

Beispiel 12

In diesem Beispiel wurde die Reaktion während 6 Stunden unter Verwendung von 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure, 500 IE Lipase MY und 2 ml organisches Lösungsmittel + 8 ml 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7) durchgeführt, und es wurden die Änderungen des Syntheseverhältnisses vom Cholesterin-Oleat in Abhängigkeit von der Art des organischen Lösungsmittels beobachtet. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11

Lauf Nr.	Organisches Lösungsmittel	Syntheseverhältnis (%)
1	S-2	97,0
2	S-3	96,8
3	S-4	96,7
4	S-5	96,0
5	S-6	96,0

Beispiel 13

Eine Mischung von 10 g Cholesterin, 22 g Ölsäure, 50 ml Isooctan und 200 ml (50 000 IE) einer wässrigen Lösung von Lipase MY wurde während 18 Stunden bei 200 Umdrehungen pro Minute gerührt. Danach wurde Ether beigegeben und die Mischung mit wässrigem Natriumhydrogencarbonat gewaschen, um die wässrige Schicht zu entfernen. Nach mehreren Wiederholungen dieser Vorgehensweise wurde die Etherschicht über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Der Ether wurde dann wegdestilliert, womit Cholesterin-Oleat als weisses halbdurchsichtiges Rohprodukt in 96,3%iger Reinheit und mit einer Ausbeute von 16,0 g (95,0%) erhalten wurde.

Das so erhaltene Rohprodukt (6 g) wurde auf eine Silicagel-Kolonnen (Wakogel C200, 160 g, ein Produkt der Wako Pure Chemical Industries) geladen und mit 2000 ml Benzol eluiert, womit 5,3 g Cholesterin-Oleat erhalten wurden. Das Infrarot-Absorptionsspektrum (IR), der Schmelzpunkt, die Farbenentwicklung auf einer Dünnschicht-Chromatographie-Platte (TLC) und der Rf-Wert dieses Produkts lagen in vollständiger Übereinstimmung mit denjenigen des als Referenz verwendeten Normstoffes Cholesterin-Oleat.

Beispiel 14

Die Reaktion wurde während 45 Stunden durchgeführt, indem eine Mischung von 1 g Cholesterin, 2,2 g Isostearinsäure (ein Produkt der Emery Industries), 0,333 g (10 000 IE) Lipase MY, 30 ml Isooctan und 80 ml 0,05 M Phosphatpuffer bei 200 Umdrehungen pro Minute gerührt wurden. Im Laufe der Reaktion wurden der Reaktionsmischung Proben entnommen, um das Syntheseverhältnis des gewünschten Esters zu bestimmen. Das Verhältnis lag bei 28,5% nach 3 Stunden, 85,9% nach 23 Stunden und 91,0% nach 45 Stunden.

Die Reaktion wurde 45 Stunden nach dem Start beendet, worauf mit wässrigem Methanol extrahiert wurde, um das nicht umgesetzte Substrat zu entfernen. Eine Destillation der Isooctan-Schicht ergab 1,53 g nicht umgesetzte Isostearinsäure und 1,54 g des gewünschten Isostearinsäure-Esters.

Der so erhaltene Cholesterin-Isostearinsäure-Ester ergab einen einzigen Fleck auf einer TLC-Platte und erwies sich in der Iatroscan-Analyse als 100% rein.

Beispiel 15

Eine Mischung von 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure, 8 ml Isooctan, 8 ml Wasser und 500 IE Lipase MY wurde während 3 Stunden gerührt. Danach wurde von der oberen Schicht eine Probe entnommen und auf das Syntheseverhältnis des Cholesterin-Oleats analysiert. Dieses Verhältnis wurde auf folgende Weise berechnet:

$$\text{Syntheseverhältnis (\%)} = \frac{(\text{Gewünschte Peak-Fläche für den Ester})}{(\text{Peak-Fläche für die erste Komponente} + \text{gewünschte Peak-Fläche für den Ester})} \times 100$$

Der vorangehende Terminus «erste Komponente» bedeutet dasjenige der beiden als Reaktionssubstrate geladenen Substrate, welches bezüglich der Anzahl Mol kleiner ist. Wenn beispielsweise die Fettsäure in einer Menge von 3 Mol pro 5 Mol Alkohol geladen wird, bildet der Alkohol die erste Komponente. Entsprechend der vorangehenden Gleichung wird das Verhältnis gleich 100%, wenn die bezüglich der Anzahl Mol in kleinerer Menge geladene Komponente aus der Reaktionsmischung verschwunden ist, und zwar unabhängig von 10 der übrigbleibenden Menge der im Überschuss geladenen Menge der anderen Komponente. In der nachfolgenden Beschreibung werden, wenn nicht anderes ausdrücklich angegeben ist, die Daten für das Syntheseverhältnis entsprechend der vorangehenden Gleichung (I) berechnet. Danach 15 wurde die Reaktionsmischung stehengelassen. Die resultierende obere Isooctan-Schicht wurde entfernt, während die Grenzflächenportion weiterhin in Kontakt mit Wasser blieb. Dem Rückstand wurden 5 ml Isooctan beigegeben, die Mischung wurde gerührt und stehengelassen, und die 20 Isooctan-Schicht wurde entfernt, worauf die in der Grenzflächenportion übrigbleibenden nicht umgesetzten Substrate und das Reaktionsprodukt durch Waschen entfernt wurden. Nach 5 Wiederholungen dieser Vorgehensweise wurden der 25 enzymhaltigen wässrigen Schicht wiederum 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure und 8 ml Isooctan beigegeben und die Reaktion wurde während 3 Stunden durchgeführt.

Die Erfindung wurde durch Wiederholung der vorangehenden Vorgehensweise ausgeübt, wobei die Mischung zum Durchführen der Reaktion behandelt wurde, die obere die 30 Substrat- und Reaktionsprodukte enthaltende Isooctan-Schicht entfernt wurde, während die Lipase enthaltende wässrige Schicht und die Grenzflächenschicht belassen wurden, und die Substrate sowie Isooctan für den nächsten Reaktionslauf erneut beigegeben wurden.

Die so erhaltenen Resultate sind in Fig. 2 dargestellt. In Fig. 2 ist das Syntheseverhältnis des Esters (%) auf der Ordinate und die Zeitdauer (h) seit dem Beginn der Reaktion im ersten Lauf (Zeitpunkt Null) auf der Abszisse eingetragen, wobei das bei jedem Lauf durch 3 Stunden dauerndes 40 Umsetzen der neu eingegebenen Substrate miteinander erhaltene Syntheseverhältnis des Esters in Abhängigkeit von derjenigen Zeit dargestellt ist, zu der ein Substrataustausch durchgeführt wurde. Während der zwischen der Bestimmung des Verhältnisses und dem Substrataustausch liegenden Zeitdauer wurde die Reaktionsmischung stehengelassen, wobei 45 Enzym und Substrate miteinander in Kontakt waren.

Fig. 2 zeigt, dass das Syntheseverhältnis des Esters nach 130 Stunden noch immer nicht kleiner ist als 90% und dass 50 also das Enzym seine Aktivität überhaupt nicht verliert, wenn man es in 14 Reaktionsläufen wiederholt verwendet (oder 43 Mal, wenn man unterstellt, dass der Reaktionslauf in dreistündigen Zyklen wiederholt wird).

Beispiel 16

Die Vorgehensweise vom Beispiel 15 wurde befolgt, ausser dass die Reaktionsmischung aus 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure, 2 ml Isooctan, 8 ml Wasser und 500 IE (16,7 mg) Lipase MY bestand.

Die erhaltenen Resultate sind in Fig. 3 auf gleiche Weise wie in Fig. 2 dargestellt.

Fig. 2 zeigt, dass ein Syntheseverhältnis des Esters von mindestens 94% in jedem wiederholten dreistündigen Reaktionslauf bis zum Erreichen von etwa 130 Stunden gesichert 65 werden kann, insbesondere kann die Synthesereaktion etwa 28 Mal ohne Enzymverlust wegen eines Austausches der Phase mit dem organischen Lösungsmittel wiederholt werden.

Beispiel 17

Eine Mischung von 100 mg Cholesterin und 220 mg Ölsäure wurde während 18 Stunden mit 0,5 ml einer wässrigen Lösung von 500 IE Lipase MY behandelt, wobei dem System Wasser in einer Menge von 0,5–10,0 ml beigegeben wurde.

Nach der Umsetzung wurden der Reaktionsmischung 10 ml Isooctan beigegeben und die resultierende Mischung wurde stehengelassen. Die obere Schicht wurde mit Ausnahme der Grenzflächenschicht entfernt, erneut wurden 100 mg Cholesterin und 220 mg Ölsäure der unteren Enzymlösung beigegeben und die Reaktion wurde während 18 Stunden durchgeführt. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12

Lauf Nr.	Beigegebene Menge Wasser (ml)	Syntheseverhältnis (%)		
		1. Lauf	2. Lauf	3. Lauf
1	0	87,5	86,8	87,0
2	0,5	97,6	97,3	97,4
3	1,0	97,4	97,4	97,3
4	2,0	98,2	98,0	97,9
5	4,0	97,4	97,0	96,8
6	6,0	96,9	96,9	96,9
7	10,0	92,7	92,0	92,0

In diesem Beispiel wurde die Reaktion in einem wässrigen System durchgeführt, dann wurde das System zu einem Wasser und Isooctan enthaltenden System konvertiert und dieses wurde nach Abscheidung des Enzyms in einem wässrigen System wiederverwendet. Die in Tabelle 12 dargestellten Daten zeigen klar, dass auch wenn die Menge Wasser im Reaktionssystem gross ist, das Gleichgewicht der Reaktion sich zur Synthese hin verlagert, dass das Enzym gut wiederverwendet werden kann, indem das System nach der Reaktion zu einem Zweiphasen-System Wasser – organisches Lösungsmittel konvertiert wird, und dass ausserdem das so abgeschiedene Enzym wiederholt verwendet werden kann, ohne Aktivitätsverluste zu erleiden. Die vorangehenden Resultate zeigen noch, dass auch wenn Cholesterin im System zum Teil ungelöst verbleibt, die Synthesereaktion auf zufriedenstellende Weise ablaufen kann.

Beispiel 18

Die Reaktion wurde in einem Reaktionssystem durchgeführt, das aus 100 mg Cholesterin, 220 mg einer von verschiedenen Fettsäuren, 500 IE Lipase MY und 10 ml Isooctan bestand. Danach wurden 3 ml Wasser beigegeben und die Mischung wurde gerührt, worauf eine Phasentrennung als Zweiphasen-System Wasser – organisches Lösungsmittel folgte. Die Isooctan-Schicht wurde mit Ausnahme der Grenzflächenschicht entfernt, eine Substratlösung aus 100 mg Cholesterin, 220 mg der jeweiligen Fettsäure und 10 ml Isooctan wurde erneut der übrigbleibenden wässrigen Enzymlösung beigegeben und die Reaktion wurde während 18 Stunden durchgeführt.

Die vorangehend angegebene Vorgehensweise wurde dreimal wiederholt. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13

Lauf Nr.	Fettsäure	Syntheseverhältnis (%)		
		1. Lauf	2. Lauf	3. Lauf
1	B-1	88,9	98,6	98,7
1	B-2	99,0	98,8	98,8
1	B-3	98,5	98,0	98,4

In diesem Beispiel wurde die Reaktion in einem Zweiphasen-System Wasser – organisches Lösungsmittel durchgeführt, dann wurde das Enzym nach Konversion des Systems zu einem Wasser und Isooctan enthaltenden System abgeschieden und wiederverwendet. Aus den in der vorangehenden Tabelle 13 dargestellten Daten geht hervor, dass die Reaktion gut abläuft und die durch Beigabe von Wasser nach der Reaktion durchgeführte Konversion des Systems zu einem Zweiphasen-System Wasser – organisches Lösungsmittel zu einer guten Phasentrennung führt, wodurch das Enzym wiedergewonnen und wiederverwendet werden kann.

Beispiel 19

Die im Beispiel 18 nach der ersten Reaktion erhaltene Reaktionsmischung wurde ohne Beigabe von 3 ml Wasser durch einen 0,45 µm Membranfilter aus Teflon filtriert. Die verwendete Lipase MY (Pulver) blieb ungelöst, wobei sie an der Wandung des Reaktionsgefässes haften blieb oder Blöcke bildete, sie konnte aber durch Waschen des Reaktionsgefässes mit zwei 10 ml Portionen von Isooctan und anschliessende Filtration wiedergewonnen werden.

Das wiedergewonnene Enzym wurde zusammen mit dem Membranfilter in dasselbe Reaktionsgefäss zurückgebracht, es wurde dieselbe Substratlösung wie im Beispiel 18 beigegeben und die Reaktion wurde wiederum während 18 Stunden durchgeführt. Diese Vorgehensweise wurde dreimal wiederholt. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14

Lauf Nr.	Fettsäure	Syntheseverhältnis (%)		
		1. Lauf	2. Lauf	3. Lauf
1	B-1	98,9	98,5	98,3
1	B-2	99,0	98,7	98,9
1	B-3	98,5	97,8	98,0

In diesem Beispiel wurde das Enzym durch Verwendung eines Membranfilters abgeschieden und wiederverwendet. Die in Tabelle 14 dargestellten Daten zeigen, dass ein in dispergiertem Zustand vorliegendes Enzym durch Filtration zwecks Wiederverwendung wiedergewonnen werden kann.

Beispiel 20

Einer Substratlösung aus 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure und 10 ml Isooctan wurden 500 IE (16,7 mg) pulverförmiger Lipase MY beigegeben und die Reaktion wurde während 18 Stunden durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde bei 8000 Umdrehungen pro Minute während 10 Minuten zentrifugiert, um dadurch die suspendierten Enzymteilchen zu fällen. Der Überstand wurde durch Dekantieren entfernt, die Enzymteilchen wurden zum selben Reaktionsgefäss wie zuvor zurückgebracht und nach Beigabe

einer neuen Portion der Substratlösung wurde die Synthesereaktion wiederholt.

Die vorangehende Vorgehensweise zur Synthesereaktion wurde insgesamt dreimal wiederholt. Das Syntheseverhältnis lag bei 98,5% in der ersten Reaktion, 97,3% in der zweiten Reaktion und 96,8% in der dritten Reaktion.

Dieses Beispiel, in welchem die Synthesereaktion in einem System mit einem wasserhaltigen organischen Lösungsmittel durchgeführt und das Enzym durch Zentrifugation von der Reaktionsmischung getrennt und wiederverwendet wurde, zeigt, dass ein im Reaktionssystem suspendiertes Enzym durch Zentrifugation zwecks Wiederverwendung wiedergewonnen werden kann.

Beispiel 21

Einer Substratlösung aus 100 mg Cholesterin, 220 mg α -Hydroxypalmitinsäure und 2 ml Isooctan wurde eine wässrige Lösung von 1000 IE (33,3 mg) Lipase MY in 8 ml Wasser beigegeben und die Reaktion wurde während 72 Stunden durchgeführt. Nach der Umsetzung wurde die Portion der Reaktionsmischung in der emulgierten oberen Schicht portionsweise filtriert, wobei eine aus Polypropylen hergestellte hydrophobe poröse Membran «Duraguard 2400» (Porosität 38%; maximale Porengrösse $0,02 \times 0,2 \mu\text{m}$; kritische Oberflächenspannung 0,35 n/m; ein Produkt der Polyplastics Co.) verwendet wurde. Die wässrige Enzymlösung konnte wegen ihrer Oberflächenspannung, die höher ist als die kritische Oberflächenspannung dieser Membran, die Oberfläche dieser Membran nicht benetzen und daher konnte sie nicht durch die auf der Membranoberfläche befindlichen Mikroporen durchtreten, während Isooctan die Mikroporen durchdrang.

Die nicht durchtretende wässrige Enzymlösung wurde zum Reaktionsgefäß zurückgeleitet und nach erneuter Beigabe derselben Substratlösung wie im vorangehenden wurde die Reaktion wieder während 72 Stunden durchgeführt.

Das Syntheseverhältnis lag bei 73,2% in der ersten vorstehend genannten Reaktion und bei 69,5% in der zweiten Reaktion.

Dieses Beispiel, in welchem die Synthesereaktion in einem Zweiphasen-System Wasser – organisches Lösungsmittel durchgeführt und die Reaktionsmischung unter Verwendung einer hydrophoben porösen Membran zum selektiven Durchlassen des organischen Lösungsmittel filtriert wurde, zeigt, dass die wässrige Enzymlösung durch Verwendung der auf die Oberflächenspannung basierenden selektiven Permeabilität der Membran auch von der einigermassen emulgierten Reaktionsmischung getrennt werden kann.

Beispiel 22

Die Reaktion wurde auf gleiche Weise wie im Beispiel 15 unter Verwendung einer in Tabelle 15 angegebenen Alkohol-Komponente (in einer Menge von 100 mg) zusammen mit den jeweils in derselben Tabelle in spezifizierten Mengen angegebenen Fettsäuren bzw. Enzymen durchgeführt, wobei jeweils die in derselben Tabelle angegebenen Reaktionssysteme und Reaktionszeiten verwendet wurden, und die wässrige Enzymlösung wurde von der Phase mit dem den gewünschten Ester und nicht umgesetzte Substrate enthaltenden organischen Lösungsmittel getrennt. Auf diese Weise wurde die Synthesereaktion unter wiederholter Verwendung des Enzyms wiederholt. Die erhaltenen Resultate sind ebenfalls in Tabelle 15 angegeben. In der Tabelle bedeutet «PB» ein 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7.0).

Tabelle 15

Lauf Nr.	Enzym (iE)	Alkohol	Fettsäure (Mol auf Basis von Alkohol)	PB (ml)	Organisches Lösungsmittel (ml)	Zeit (h)	Syntheseverhältnis (%)				
							Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5
1	E-1 (500)	A-1	B-3 (3)	8	S-2 (2)	18	98,5	98,5	98,4	98,3	98,2
2	E-1 (500)	A-1	B-4 (3)	8	S-2 (2)	18	96,5	95,8	96,1	95,7	96,3
3	E-1 (1000)	A-1	B-8 (3)	8	S-2 (2)	18	94,3	94,1	94,2	93,8	93,9
4	E-1 (1000)	A-1	B-12 (3)	8	S-2 (2)	45	91,0	90,7	88,4	–	–
5	E-1 (1000)	A-1	B-6 (3)	8	S-2 (2)	48	85,5	86,0	80,1	–	–
6	E-1 (500)	A-2	B-1 (3)	8	S-2 (2)	18	95,4	95,6	95,1	94,8	94,9
7	E-1 (500)	A-3	B-1 (3)	8	S-2 (2)	18	69,3	69,0	70,7	67,9	69,0
8	E-1 (500)	A-4	B-1 (3)	8	S-2 (2)	18	92,8	94,7	93,1	90,9	92,5
9	E-1 (500)	A-5	B-1 (3)	8	S-2 (2)	18	55,3	56,0	55,8	55,3	56,0
10	E-1 (500)	A-6	B-1 (3)	8	S-2 (2)	18	70,5	70,3	71,4	69,1	70,2
11	E-2 (1000)	A-1	B-1 (3)	8	S-2 (2)	18	85,3	87,0	84,8	83,6	85,1
12	E-3 (1000)	A-1	B-1 (3)	8	S-2 (2)	18	55,2	56,5	56,4	55,3	55,2
13	E-5 (500)	A-1	B-1 (3)	8	S-2 (2)	18	97,7	97,9	96,8	97,3	97,5
14	E-1 (500)	A-1	B-1 (3)	8	S-3 (2)	18	96,8	96,7	96,7	96,8	96,8
15	E-1 (500)	A-1	B-1 (3)	8	S-4 (2)	18	96,7	96,8	96,7	96,6	96,5
16	E-1 (500)	A-1	B-1 (3)	8	S-5 (2)	18	96,5	96,5	96,7	96,6	96,5
17	E-1 (500)	A-1	B-1 (3)	8	S-6 (2)	18	96,0	96,2	96,0	96,1	96,3
18	E-1 (500)	A-1	B-1 (3)	8	S-1 (2)	18	96,5	96,4	96,4	96,5	96,4
19	E-1 (1000)	A-9	B-8 (1,2)	8	S-2 (2)	5	86,7	87,2	88,4	85,0	87,4
20	E-1 (1000)	A-9	B-3 (1,2)	8	S-2 (2)	5	84,3	85,1	83,7	85,8	84,4
21	E-1 (1000)	A-9	B-1 (1,2)	8	S-2 (2)	5	96,9	95,0	95,5	94,9	94,8
22	E-1 (1000)	A-9	B-13 (1,2)	8	S-2 (2)	5	96,9	95,2	94,9	95,9	96,1
23	E-1 (1000)	A-9	B-6 (1,2)	8	S-2 (2)	24	87,9	86,0	89,7	87,8	86,0
24	E-1 (1000)	A-8	B-8 (1,2)	8	S-2 (2)	24	64,7	65,4	63,4	–	–
25	E-1 (1000)	A-8	B-3 (1,2)	8	S-2 (2)	24	97,9	98,2	97,0	–	–
26	E-1 (1000)	A-8	B-1 (1,2)	8	S-2 (2)	5	94,5	95,6	97,6	–	–
27	E-1 (1000)	A-8	B-13 (1,2)	8	S-2 (2)	5	89,9	92,3	90,4	–	–
28	E-1 (1000)	A-8	B-6 (1,2)	8	S-2 (2)	24	94,2	93,8	94,3	–	–

Tabelle 15 (Fortsetzung)

Lauf Nr.	Enzym (IE)	Alkohol	Fettsäure (Mol auf Basis von Alkohol)	PB (ml)	Organisches Lösungsmittel (ml)	Zeit (h)	Syntheseverhältnis (%)				
							Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5
29	E-1 (1000)	A-7	B-3 (1,2)	8	S-2 (2)	72	79,1	78,2	-	-	-
30	E-1 (1000)	A-7	B-1 (1,2)	8	S-2 (2)	72	94,3	94,2	-	-	-
31	E-1 (1000)	A-7	B-13 (1,2)	8	S-2 (2)	72	95,9	94,3	-	-	-

Die Daten in Tabelle 15 zeigen, dass es bei allen verwendeten Kombinationen von verschiedenen Alkoholen, Fettsäuren, Enzymen und organischen Lösungsmitteln möglich ist, in einem Zweiphasen-System Wasser – organisches Lösungsmittel das Enzym zu trennen und wiederzuverwenden, wobei die wiederholte Verwendung des Enzyms nur geringe Verluste an Enzym zur Folge hat.

Beispiel 23

Unter Verwendung einer Apparatur zur kontinuierlichen Umsetzung, umfassend eine Glaskolonie (G) von 2 cm Innendurchmesser und 2 m Länge, eine Pumpe (P1) und einen Auffangbehälter (T1), wie es aus dem Flussdiagramm der Fig. 4 ersichtlich ist, wurde ein Teil (G2) der Kolonne mit 600 ml einer wässrigen Lösung von Lipase MY in einem 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) mit einer Enzymkonzentration von 125 IE/ml gefüllt. Eine Substratlösung aus 2500 mg Cholesterin, 2500 mg Ölsäure und 250 ml Isooctan wurde mittels der Pumpe (P1) in den die wässrige Enzymlösung enthaltenden Schichtteil (G2) mit einer Fließgeschwindigkeit von 9,5 ml/Minute eingeleitet, und zwar in Form von kleinen öligen Tröpfchen durch eine am Boden der Kolonne (G) angeordnete Düse (N1).

Die eingeleiteten kleinen Tröpfchen stiegen dank der Injektionskraft und ihrer Schwimmfähigkeit durch die wässrige Enzymlösung hindurch, während sie der Reaktion unterzogen wurden, und sie wurden am oberen Teil (G1) der Glaskolonie als eine das Reaktionsprodukt enthaltende Isooctan-Schicht abgeschieden.

Man liess diese Isooctan-Schicht durch eine Düse (N2) überlaufen und führte sie mittels einer Pumpe (P2) über den Auffangbehälter (T1) wieder zur Schicht mit der wässrigen Enzymlösung (G2).

Auf diese Weise wurde die Reaktion durchgeführt, während die Substratlösung durch die wässrige Enzymlösung hindurch mehrmals rezykliert wurde. Die Änderungen des Syntheseverhältnisses des Esters in Abhängigkeit der gemessenen Zeitdauer sind in Fig. 5 dargestellt.

In Fig. 5 ist das Syntheseverhältnis (%) auf der Ordinate und die Zeitdauer der Zirkulation (h) auf der Abszisse eingetragen, wobei die Werte des Syntheseverhältnisses aufgrund von Proben, die der in den Auffangbehälter (T1) fließenden Reaktionsmischung zu vorbestimmten Zeiten entnommen wurden, bestimmt und in Abhängigkeit von den entsprechenden Zirkulationszeiten dargestellt worden.

Fig. 5 zeigt, dass das Verhältnis in etwa 4 Stunden 95% erreicht, was beinahe einen Gleichgewichtszustand bedeutet. Es ist auch erkennbar, dass, weil die Zuleitungsrate zur Kolonne 9,5 ml/Minute beträgt, es etwa 26,3 Minuten braucht, bis die gesamten 250 ml Substratlösung mit der wässrigen Enzymlösung einmal in Kontakt getreten sind, und dass eine etwa 9-malige Zirkulation die Reaktion zum Gleichgewichtszustand führt. Die Anzahl der Zirkulationen variiert selbstverständlich in Abhängigkeit von der Art und Weise, wie die Tröpfchen gebildet und vernichtet werden und von der Retentionsdauer, und diese Anzahl kann durch Ver-

wendung von Kolonnenpackungen, Blendenplatten, Rührung usw. geändert werden.

Beispiel 24

Unter Verwendung eines Reaktionsgefäßes zur kontinuierlichen Umsetzung, umfassend eine Glaskolonie (G) von 2 cm Innendurchmesser und 2 m Länge, Pumpe (P1, P2, P3), einen Verteiler (B), einen automatischen Probensammler (A), einen Auffangbehälter (T1), ein Mischgefäß (T2), einen Rohstofftank (T3), einen Tank für die Reaktionsmischung (T4) und ein Testglas (T5), das einen die Reaktion beendenden Agens enthält, wie es aus dem Flussdiagramm der Fig. 6 ersichtlich ist, wurde ein Teil (G2) der Kolonne mit 600 ml einer Lösung von Lipase MY mit einer Enzymkonzentration von 125 IE/ml in einem Phosphatpuffer (pH 7,0) gefüllt. Eine Substratlösung aus 2000 mg Cholesterin, 3000 mg Ölsäure und 600 ml Isooctan wurde mittels der Pumpe (P1) in den die wässrige Enzymlösung enthaltenden Schichtteil (G2) mit einer Fließgeschwindigkeit von 15,5 ml/Minute eingeleitet, und zwar in Form von kleinen öligen Tröpfchen durch eine am Boden der Kolonne angeordnete Düse (N1).

Die eingeleiteten kleinen Tröpfchen stiegen dank der Injektionskraft und ihrer Schwimmfähigkeit durch die wässrige Enzymlösung hindurch, während sie der Reaktion unterzogen wurden, und sie bildeten am oberen Teil (G1) der Glaskolonie eine das Reaktionsprodukt enthaltende Isooctan-Schicht. Man liess diese Isooctan-Schicht durch eine Düse (N2) überlaufen und hielt sie zeitweise im Auffangbehälter (T1) zurück, während ein Teil davon kontinuierlich abgezogen und über den Verteiler (B) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,25 ml/Minute mittels einer Pumpe (P2) zum Tank für die Reaktionsmischung (T4) zugeleitet wurde.

Der aus dem Auffangbehälter (T1) überlaufende übrige Teil der Isooctanlösung wurde in das Mischgefäß (T2) eingeleitet und mit einer neuen Portion der Substratlösung von gleicher Zusammensetzung wie im vorangehenden gemischt, wobei diese Substratlösung aus dem Rohstofftank (T3) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,25 ml/Minute mittels der Pumpe (P3) zugeleitet wurde. Die resultierende gemischte Substratlösung wurde erneut mit einer Fließgeschwindigkeit von 15,5 ml/Minute in den Teil (G2) der Glaskolonie mittels der Pumpe (P1) eingeleitet.

In 3-stündigen Zeitabständen entnahm der automatische Probensammler (A) Proben aus der Reaktionsmischung und er leitete diese Proben zum Testglas (T5), der einen die Reaktion beendenden Agens (1:1 Aceton + Ethanol) enthielt.

Auf diese Weise wurde die Reaktion durchgeführt, während die Substratlösung durch die wässrige Enzymlösung hindurch mehrmals rezykliert wurde, während in 3-stündigen Zeitabständen Proben aus der Reaktionsmischung vom automatischen Probensammler (A) entnommen und in bezug auf das Syntheseverhältnis des Esters untersucht wurden. Die so erhaltenen Daten sind in Fig. 7 dargestellt.

In Fig. 5 ist das Syntheseverhältnis (%) auf der Ordinate und die Zeitdauer (h) seit dem Beginn der Reaktion (Zeit-

punkt Null) auf der Abszisse eingetragen, wobei die Werte des Syntheseverhältnisses in Abhängigkeit von den entsprechenden Zeiten dargestellt sind.

Während der Zeitdauer seit dem Beginn der Reaktion bis etwa 2 Stunden danach befand sich die Isooctan-Schicht im oberen Teil (G1) der Kolonne in einem emulgierten Zustand, mit fortschreitender Reaktion begann sie aber, eine Zweiphasen-Abscheidung zu zeigen, und die Trennung war nach etwa 5 Stunden vollständig.

Fig. 7 zeigt, dass wenn man als Reaktionssystem ein System mit Wasser und organischem Lösungsmittel verwendet, eine Emulgierung auch nicht in einer einfachen Sprühkolonne stattfindet wie diejenige, die in Fig. 6 dargestellt ist, sondern dass der gewünschte Ester unter wiederholter Verwendung des Enzyms kontinuierlich synthetisiert werden kann, ohne dass man das Enzym während 150 Stunden oder noch mehr auswechseln oder nachfüllen muss, während das Syntheseverhältnis auf 95% oder mehr gehalten werden kann.

Beispiel 25

Ein Gefäss wurde mittels einer aus Polypropylen hergestellten hydrophoben Membran «Duraguard 2500» [ein Produkt der Polyplastics Co.; Dicke 25 µm; mittlere Porengrösse 0,1 µm; maximale Porengrösse 0,04 × 0,4 µm; Porosität 45%; wirksame Oberflächengrösse (Membranfläche minus die zum Ausrüsten des Gefässes mit der Membran nötige Fläche) 9,6 cm²], in zwei Räume unterteilt, einen oberen und einen unteren. Der untere Raum (Kapazität 50 cm³) wurde mit 50 cm³ einer wässrigen Lösung von Lipase MY mit einer Enzymkonzentration von 62,5 IE/ml gefüllt. Ein mit diesem Raum verbundenes Verbindungsrohr war ebenfalls mit der gleichen wässrigen Enzymlösung gefüllt, so dass der Flüssigkeitspegel etwa 20 cm höher stand als die Membran.

Der obere Raum des vorgenannten Gefässes wurde mit einer Substratlösung geladen, die aus 20 g Cholesterin, 44 mg Ölsäure und 10 ml Isooctan bestand. Das gesamte Gefäss wurde auf einem Schüttler mit einem Hub von 6 cm und einer Frequenz von 120 Perioden pro Minute geschüttelt, um die Reaktion durchzuführen.

Nach 18 Stunden Reaktionsdauer betrug das Syntheseverhältnis 94,6%. Das Reaktionssystem war nicht emulgiert. Es wurde kein Eindringen von Wasser in die Substratphase beobachtet.

Wenn die Reaktion auf die vorangehend dargestellte Weise durchgeführt wird, indem das Enzym und die Substrate

durch eine poröse Reaktionsmembran hindurch miteinander in Kontakt gebracht werden, kann die eine hohe Oberflächenspannung aufweisende wässrige Enzymlösung weder die hydrophobe Membran benetzen noch durch die Mikroporen der genannten Membran hindurchtreten, somit wird sie mit den hydrophoben Substraten in der Substratlösung nicht gemischt. Es dringen im Gegenteil die hydrophoben Substrate in die Mikroporen der hydrophoben Membran hinein und sie kommen in Kontakt mit derjenigen Portion des Enzyms, die auf der genannten hydrophoben Grenzschicht an der unteren Seite der Membran absorbiert ist. In diesem Falle führt eine Erhöhung der Frequenz des Kontakts zwischen dem Enzym und den Substraten zu einer verkürzten Reaktionsdauer. Somit kann die Verwendung eines krepp-, spiral-, rohr-, hohlfaserförmigen oder ähnlichen Typs von Membran anstelle des vorangehend erwähnten flachen Membrantyps dazu dienen, die Reaktionsdauer weiter zu verkürzen.

Beispiel 26

Eine durch Oberflächenbehandlung hydrophil gemachte Membran «Duraguard 3501» (ein Produkt derselben Firma wie im vorangehenden; Dicke, Porengrösse und Porosität waren die gleichen wie im vorangehenden) wurde anstelle der im Beispiel 25 verwendeten Membran «Duraguard 2500» verwendet. Die von der Membran getrennten Räume, der obere und der untere, wurden jeweils mit der gleichen Substratlösung und Enzymlösung wie im vorangehenden geladen. Im Verbindungsrohr stand der Flüssigkeitspegel gleich hoch wie die Membran.

Die Reaktion wurde während 18 Stunden auf gleiche Weise wie im Beispiel 25 durchgeführt. Das Reaktionssystem war nicht emulgiert, und das Syntheseverhältnis betrug 92,0%.

Wenn wie in diesem Beispiel eine hydrophile Membran verwendet wird, tritt die wässrige Enzymlösung durch die Mikroporen der Membran hindurch und sie kommt mit den Substraten im oberen Teil der Membran in Kontakt und katalysiert dort die Reaktion.

Beispiel 27

Die Vorgehensweise vom Beispiel 25 wurde unter Verwendung von 4 Arten von Membranen wie in Tabelle 16 dargestellt befolgt. Das Volumen des unteren Raumes betrug 4 cm³ und die anderen Reaktionsbedingungen waren die gleichen wie im Beispiel 25. Die erhaltenen Resultate sind ebenfalls in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16

Lauf Nr.	1	2	3	4
Membranmaterial	Regenerierte Cellulose	Teflon	Nitrocellulose	Nitrocellulose
Mittlere Porengrösse (µm)	0,45	0,5	0,45	3,0
Höhenunterschied zwischen Verbindungsrohr und Membran (cm)	0	30	0	0
Reaktionsdauer (h)	120	23	23	23
Syntheseverhältnis (%)	63,2	80,7	70,2	85,4
Emulgierung	keine	keine	keine	keine

Die in Tabelle 16 angegebenen Daten zeigen, dass die Synthesereaktion mit jeder Membran ohne Emulgierung des Reaktionssystems gleichmässig abläuft.

Beispiel 28

Es wurde die gleiche Membran wie im Beispiel 25 verwendet (ausser dass die wirksame Membranfläche 102 cm²

betrug). Der untere Raum hatte eine Kapazität von 82 cm³ und wurde mit einer wässrigen Lösung von Lipase MY mit einer Enzymkonzentration von 62,5 IE/ml gefüllt. Im Verbindungsrohr stand der Flüssigkeitspegel 41 cm höher als die Membran. Der obere Raum wurde mit einer Substratlösung geladen, die aus 400 g Cholesterin, 880 mg Ölsäure und 40 ml Isooctan bestand. Auf dieser Membran wurde ein magnetischer Rührer gelegt und gedreht, um die Substratphase zu rühren. Das gesamte Gefäß wurde in einen Raum von konstanter Temperatur angeordnet und die Reaktion wurde während 24 Stunden durchgeführt. Die erhaltenen Resultate sind in der nachstehenden Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17

Lauf Nr.	Reaktionsdauer (h)	Syntheseverhältnis (%)
1	1	10,0
2	2	22,8
3	3	38,7
4	4	51,2
5	5	61,7
6	6	70,8
7	7	77,0
8	8	81,5
9	9	87,0
10	10	90,0
11	16	95,4
12	24	96,2

Die vorangehend in den Beispielen 25–28 erreichten Resultate zeigen, dass eine grössere Membranfläche einer grösseren Menge der Substrate ermöglicht, der Synthesereaktion unterzogen zu werden, und dass die wirksame Membranfläche einer der wichtigen Faktoren ist, welche die Geschwindigkeit der Synthese beeinflussen.

Beispiel 29

Es wurde die gleiche Membran wie im Beispiel 26 verwendet (ausser dass die wirksame Membranfläche 10,3 cm² betrug). Der untere Raum hatte eine Kapazität von 4,1 cm³ und wurde mit einer wässrigen Lösung von Lipase MY mit verschiedenen Konzentrationen gefüllt. Im Verbindungsrohr wurde der Flüssigkeitspegel 41 cm höher als die Membran gesetzt, und die Reaktion wurde auf gleiche Weise durchgeführt.

Die Daten für das Syntheseverhältnis nach 3 Stunden sind in der nachstehenden Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18

Lauf Nr.	Konzentration der wässrigen Lipaselösung (IE/ml)	Syntheseverhältnis (%)
1	600	64,8
2	300	65,3
3	200	65,2
4	100	63,2
5	62,5	46,4

Die Daten der Tabelle 18 legen nahe, dass die Adsorption des Enzyms an der Hydrophil-Hydrophob-Grenzfläche bei etwa 200 IE/ml eine Sättigung erreicht.

Beispiel 30

Unter Verwendung einer wässrigen Lösung von Lipase MY (600 IE/ml) und einer Substratlösung, in der eine in Tabelle 19 spezifizierte Alkohol-Komponente (100 mg) mit einer Fettsäure und einem organischen Lösungsmittel kombiniert wurde, die beide in Tabelle 19 angegeben sind, wurde die Reaktion in einem geeigneten Reaktionsgefäß unter Verwendung von Duraguard 2500 durchgeführt. Die erhaltenen Resultate sind in der nachstehenden Tabelle 19 zusammen mit den Daten über die Reaktionsdauer dargestellt.

Tabelle 19

Lauf Nr.	Alkohol (100 mg)	Fettsäure (Mol auf Basis von Alkohol)	Organisches Lösungsmittel (ml)	Zeitdauer (hg)	Syntheseverhältnis (%)
1	A-1	B-1 (3)	S-2 (20)	18	97,1
2	A-1	B-2 (3)	S-2 (20)	18	97,8
3	A-1	B-3 (3)	S-2 (20)	18	98,3
4	A-1	B-4 (3)	S-2 (20)	18	96,0
5	A-1	B-8 (3)	S-2 (20)	18	94,5
6	A-1	B-12 (3)	S-2 (20)	45	90,8
7	A-1	B-6 (3)	S-2 (20)	48	86,0
8	A-2	B-1 (3)	S-2 (20)	18	95,1
9	A-3	B-1 (3)	S-2 (20)	18	69,0
10	A-4	B-1 (3)	S-2 (20)	18	93,1
11	A-5	B-1 (3)	S-2 (20)	18	55,8
12	A-6	B-1 (3)	S-2 (20)	18	71,7
13	A-9	B-8 (1,2)	S-2 (20)	5	87,2
14	A-9	B-3 (1,2)	S-2 (20)	5	85,3
15	A-9	B-1 (1,2)	S-2 (20)	5	95,8
16	A-9	B-13 (1,2)	S-2 (20)	5	95,1
17	A-9	B-6 (1,2)	S-2 (20)	24	87,9
18	A-8	B-8 (1,2)	S-2 (20)	24	66,5
19	A-8	B-3 (1,2)	S-2 (20)	24	97,4
20	A-8	B-1 (1,2)	S-2 (20)	5	94,7
21	A-8	B-13 (1,2)	S-2 (20)	5	90,0
22	A-8	B-6 (1,2)	S-2 (20)	24	94,3
23	A-7	B-3 (1,2)	S-2 (20)	72	78,3
24	A-7	B-1 (1,2)	S-2 (20)	72	94,2
25	A-7	B-13 (1,2)	S-2 (20)	72	94,5
26	A-1	B-1 (3)	S-3 (20)	18	96,8
27	A-1	B-1 (3)	S-4 (20)	18	96,7
28	A-1	B-1 (3)	S-5 (20)	18	96,4
29	A-1	B-1 (3)	S-6 (20)	18	96,2
30	A-1	B-1 (3)	S-1 (20)	18	96,4

Bei der Durchführung der in den Beispielen 25–28 dargestellten Vorgehensweise ist eine kontinuierliche Synthese möglich, indem man die Substrate (in Lösung) einem der durch eine Membran voneinander getrennten Räume zuleitet, während die Reaktionsmischung kontinuierlich abgezogen wird.

Beispiel 31

Zunächst wurde Lipase MY immobilisiert, indem man ein zur Immobilisierung bestimmtes Harz auf die nachstehend unter (1) oder (2) angegebene Weise beimischte.

(1) Mit 1 g ENTP-4000 (ein Produkt der Kansai Paint Co., Ltd.) wurden 10 mg Benzoin-Ethyl-Ether und 40 mg Sorbitan-Monooleat gemischt. Die Mischung wurde durch Erwärmung auf 60°C unter Rührung vollständig geschmolzen und dann auf 4°C gekühlt. 2000 IE pulverförmiges Enzym wurde beigegeben. Die resultierende Mischung

wurde gut geknetet und dann mit 2 ml Isooctan verdünnt und in Form einer Folie von 7 cm × 10 cm × 0,5 mm Grösse gestrichen. Die Folie wurde mit einer durchsichtigen Polyesterfolie überdeckt und durch Belichtung (unter Verwendung einer chemischen Lampe von Toshiba; 3 Minuten) geliert. Nach der Gelierung wurde das Harz zu viereckigen Stücken von 4–5 mm Seitenlänge geschnitten und als Präparat von immobilisiertem Enzym verwendet.

(2) Unter Verwendung von 1:1 Benzol/Heptan anstelle von Isooctan wurde die vorangehende Vorgehensweise (1) befolgt, während die Verwendung von Sorbitan-Monooleat ausgelassen wurde.

Jedem nach der vorangehenden Vorgehensweise (1) oder (2) erhaltenen Enzym wurde eine Substratlösung aus 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure und 15 ml Isooctan mit 3 ml 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) beigegeben, und die Reaktion wurde während 3 Stunden durchgeführt.

Nach Ablauf der Reaktion wurde die Reaktionsmischung filtriert. Dem so wiedergewonnenen immobilisierten Enzym wurde erneut die gleiche Substratlösung wie im vorangehenden beigegeben, und die Reaktion wurde erneut durchgeführt.

Die vorangehende Vorgehensweise für die Reaktion wurde insgesamt fünfmal wiederholt. Die erhaltenen Resultate sind in der nachstehenden Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20

Lauf Nr.	Immobilisierungs- verfahrensweise	Syntheseverhältnis (%)				
		1	2	3	4	5
1	(1)	97,7	94,8	96,5	95,4	96,8
2	(2)	96,5	97,0	96,3	94,8	95,4

Beispiel 32

Im vornhinein wurden 1000 IE Lipase MY mit 100 mg Celit und 0,1 ml Wasser gemischt, um dadurch die Adsorption des Enzyms auf dem Celit zu bewirken. Danach wurde die Mischung zu einem Präparat von immobilisiertem Enzym gemacht, indem die Vorgehensweise (2) des Beispiels 31 befolgt wurde.

Die Reaktion wurde während 4 Stunden unter Verwendung des vorangehenden Präparats von immobilisiertem Enzym und einer aus 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure in 5 ml Isooctan und 10 ml Isooctan mit 3 ml 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) bestehenden Reaktionsmischung durchgeführt, und das Syntheseverhältnis wurde bestimmt.

Danach wurde die Reaktionsmischung filtriert und das so abgeschiedene immobilisierte Enzym wurde erneut der gleichen Reaktion als immobilisiertes Enzym unterzogen.

Die vorangehende Vorgehensweise für die Reaktion wurde dreimal täglich wiederholt. Beim dritten Lauf wurde allein das Syntheseverhältnis bestimmt, während man die Reaktionsmischung ohne Filtration stehenliess, wobei das immobilisierte Enzym und die Substrate zusammen mit dem produzierten Ester im System koexistierten. Diese Mischung wurde am nächsten Tag filtriert und neuen Wiederholungen der Vorgehensweise für die Reaktion unterzogen. Auf diese Weise wurde die Reaktion während 10 Tagen weitergeführt. Die erhaltenen Resultate werden in Fig. 8 dargestellt.

In Fig. 8 ist das Syntheseverhältnis des Esters auf der Ordinate und die Zeitdauer seit der Herstellung des immobilisierten Enzyms auf der Abszisse eingetragen, wobei die Werte des Syntheseverhältnisses nach 4 Stunden Reaktionsdauer seit dem Austausch des Substrates in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt werden.

Aus dieser Figur geht hervor, dass bei Verwendung eines immobilisierten Enzyms die Aktivität des Enzyms während mindestens 10 Tagen aufrechterhalten und die Reaktion entsprechend wiederholt werden kann.

Beispiel 33

Ein Präparat von immobilisiertem Enzym wurde aus 2000 IE (19,0 mg) Cholesterin-Esterase T-18 (ein Produkt der Toyo Jozo) nach der Vorgehensweise (2) des Beispiels 31 hergestellt.

Dem Präparat von immobilisiertem Enzym wurden 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure und 15 ml Isooctan beigegeben, und die Reaktion wurde während 1 Stunde durchgeführt. Nach Ablauf der Reaktion wurde die Reaktionsmischung filtriert und das so wiedergewonnene immobilisierte Enzym wurde für den nächsten Lauf im selben Reaktionssystem wie beim ersten Lauf verwendet. Auf diese Weise wurde die Reaktion, auf 12 Tage verteilt, insgesamt 36 Mal wiederholt. Das Syntheseverhältnis beim 36. Lauf betrug 93,5%.

Danach wurde die Reaktionsmischung einmal täglich ausser an Feiertagen filtriert und es wurde die gleiche Reaktion im gleichen Reaktionssystem unter Verwendung des wiedergewonnenen immobilisierten Enzyms während weiteren 120 Tagen wiederholt, wobei die Substratlösung jeden 25 Tag durch eine frische Lösung ersetzt wurde. Am letzten Tag wurde 5 Stunden nach Start der Reaktion ein Syntheseverhältnis von 95,0% erhalten.

Beispiel 34

Nach der Vorgehensweise (2) des Beispiels 32 wurde ein Präparat von immobilisiertem Enzym aus 2000 IE (7,1 mg) von aus *Chromobacterium viscosum* abgeleiteter Lipase («Lipase T-01»; ein Produkt der Toyo Jozo) hergestellt.

Dem Präparat von immobilisiertem Enzym wurden 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure und 15 ml Isooctan mit 3 ml 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) beigegeben, und die Reaktion wurde während 48 Stunden durchgeführt. Nach Ablauf der Reaktion wurde die Reaktionsmischung filtriert und das so wiedergewonnene immobilisierte Enzym wurde für den nächsten Lauf im gleichen Reaktionssystem wie beim ersten Lauf verwendet. Auf diese Weise wurde die Reaktion dreimal wiederholt. Das Syntheseverhältnis beim dritten Lauf betrug 87,8%.

Beispiel 35

Ein Präparat von immobilisiertem Enzym wurde hergestellt, indem Lipase MY in einer Proportion von 2000 IE Enzym pro Gramm Harz nach der Vorgehensweise (1) des Beispiels 31 in ENTP-4000 eingebettet wurde.

Die Reaktion wurde unter Verwendung einer jeweils in Tabelle 21 spezifizierten Menge des vorangehenden Präparats von immobilisiertem Enzym und einer Kombination von Alkohol-Komponente, Fettsäure und organischem Lösungsmittel durchgeführt. Nach Ablauf der Reaktion wurde die Reaktionsmischung filtriert und das so wiedergewonnene immobilisierte Enzym wurde für die im gleichen Reaktionssystem wie beim ersten Lauf durchgeführte Reaktion wiederholt verwendet.

Die erhaltenen Resultate sind in der nachstehenden Tabelle 21 dargestellt.

In Tabelle 21 bedeutet «Bemerkung 1» beim Reaktionssystem, dass das genannte Reaktionssystem ein System war, in welchem das Lösungsmittelsystem aus 15 ml Isooctan mit 3 ml 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) bestand.

Tabelle 21

Lauf Nr.	Enzym (IE)	Alkohol	Fettsäure (Mol auf Basis von Alkohol)	Reaktionssystem	Zeitdauer (h)	Syntheseverhältnis		
						1.	2.	3.
1	2000	A-1	B-1 (3)	Note 1	18	97,7	96,8	97,0
2	2000	A-1	B-2 (3)	Note 1	18	98,7	96,7	98,5
3	2000	A-1	B-3 (3)	Note 1	18	98,4	97,5	97,9
4	2000	A-1	B-4 (3)	Note 1	18	96,0	96,0	96,4
5	2000	A-1	B-8 (3)	Note 1	18	94,0	94,8	95,3
6	2000	A-1	B-12 (3)	Note 1	18	85,6	83,9	87,3
7	2000	A-1	B-6 (3)	Note 1	18	56,0	57,1	56,5
8	2000	A-2	B-1 (3)	Note 1	18	95,1	94,8	96,2
9	2000	A-3	B-1 (3)	Note 1	18	68,8	69,5	67,8
10	2000	A-4	B-1 (3)	Note 1	18	93,2	94,3	93,8
11	2000	A-5	B-1 (3)	Note 1	18	55,7	56,7	56,0
12	2000	A-6	B-1 (3)	Note 1	18	71,3	70,7	70,9
13	4000	A-9	B-8 (1,2)	Note 1	5	87,3	87,8	87,1
14	4000	A-9	B-3 (1,2)	Note 1	5	85,1	86,2	85,3
15	4000	A-9	B-1 (1,2)	Note 1	5	95,5	94,7	95,2
16	4000	A-9	B-13 (1,2)	Note 1	5	95,2	94,8	94,9
17	4000	A-9	B-6 (1,2)	Note 1	24	87,8	89,3	87,9
18	4000	A-8	B-8 (1,2)	Note 1	24	65,4	66,5	65,0
19	4000	A-8	B-3 (1,2)	Note 1	24	97,7	97,2	97,4
20	4000	A-8	B-1 (1,2)	Note 1	5	94,5	94,5	94,7
21	4000	A-8	B-13 (1,2)	Note 1	5	89,7	88,9	90,0
22	4000	A-8	B-6 (1,2)	Note 1	24	94,3	93,8	94,2
23	4000	A-7	B-3 (1,2)	Note 1	72	78,3	77,8	-
24	4000	A-7	B-1 (1,2)	Note 1	72	97,1	93,7	-
25	4000	A-7	B-13 (1,2)	Note 1	72	95,4	93,9	-
26	2000	A-1	B-1 (3)	S-3	18	96,7	96,0	97,2
27	2000	A-1	B-1 (3)	S-4	18	96,8	95,9	96,0
28	2000	A-1	B-1 (3)	S-5	18	96,5	95,8	96,2
29	2000	A-1	B-1 (3)	S-6	18	96,0	95,8	96,2
30	2000	A-1	B-1 (3)	S-1	18	96,4	96,3	96,8

Beispiel 36

Celit Nr. 545 (40 g; ein bei der Johns Manvilles Sales Co. beschafftes Produkt) wurde durch Erhitzung auf 500°C während 2 Stunden in einem elektrischen Ofen aktiviert und danach in eine 2%ige Lösung von Aminopropyltriethoxysilan in Aceton bei 50°C während 20 Stunden eingetaucht. Nach dem Eintauchen wurde das Celit mit 400 ml Aceton gewaschen und filtriert, womit silaniertes Celit erhalten wurde.

Dieses silanierte Celit (20 g) wurde in eine 1%ige wässrige Lösung von Glutaraldehyd eingetaucht und, nach Umsetzung über Nacht bei 4°C, mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gut gewaschen und anschliessend filtriert, womit Aldehydo-Celit erhalten wurde.

Zu 1 g dieses Aldehydo-Celits wurden 1500 IE Enzym und 2 ml 0,1 M Phosphatpuffer beigegeben, und eine Immobilisierung wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Anschliessend wurde filtriert, womit ein in Glutaraldehydo-Celit immobilisiertes Enzym erhalten wurde.

Gesondert wurden zu 1 g des vorangehenden silanierten Celits 1500 IE Enzym, 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) und 50 mg eines Carbodiimid-Reagens (1-Cyclohexyl-3-(morpholinoethyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat) beigegeben. Nach Umsetzung über Nacht bei 4°C, Waschen mit Wasser und Filtration wurde ein in Carbodiimido-Celit immobilisiertes Enzym erhalten.

Ausserdem wurde anstelle des Celits in den vorangehenden Vorgehensweisen ein poröses Glas verwendet (CPG00500; mittlere Porengrösse 25,75 nm; Teilchengrösse entsprechend einem Sieb von 0,120–0,074 mm lichter

40 Maschenweite; ein Produkt der Electronucleonics), wobei auf gleiche Weise vorgegangen wurde, um ein in Glutaraldehydo-Glas und ein in Carbodiimido-Glas immobilisiertes Enzym zu erhalten. Das verwendete Enzym war Lipase MY.

Jedem nach den vorangehenden Vorgehensweisen hergestellten Präparat von immobilisiertem Enzym wurden 45 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure, 2 ml Isooctan und 8 ml 0,05 M Phosphatpuffer beigegeben, und die Reaktion wurde während 18 Stunden durchgeführt. Nach Ablauf der Reaktion wurde die Reaktionsmischung filtriert, das als Kuchen gewonnene immobilisierte Enzym wurde zum gleichen Reaktionsgefäss zusammen mit dem Filterpapier zurückgeführt und Reaktion wurde im vorangehend erwähnten Reaktionssystem wiederholt. Diese Vorgehensweise wurde insgesamt dreimal wiederholt. Das bei der dritten Umsetzung 55 erhaltene Syntheseverhältnis ist in der nachstehenden Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22

Lauf Nr.	Verwendetes Enzym	Syntheseverhältnis bei der 3. Umsetzung (%)
1	in Glutaraldehydo-Celit immobilisiertes Enzym	93,5
65 2	in Carbodiimido-Celit immobilisiertes Enzym	94,8
3	in Glutaraldehydo-Glas immobilisiertes Enzym	95,6

Tabelle 22 (Fortsetzung)

Lauf Nr.	Verwendetes Enzym	Syntheseverhältnis bei der 3. Umsetzung (%)
4	in Carbodiimido-Glas immobilisiertes Enzym	97,4

Beispiel 37

Präparate von immobilisiertem Enzym wurden nach der Vorgehensweise des Beispiels 36 erhalten, wobei jedoch Lipase T-01 anstelle von Lipase MY verwendet wurde.

Unter Verwendung der vier Präparate von immobilisiertem Enzym wurde die Reaktion im gleichen Reaktionssystem während 48 Stunden durchgeführt. Als Resultat wurden jeweilige Syntheseverhältnisse von 92,4%, 88,9%, 94,5% und 92,4% erhalten.

Beispiel 38

Zu 75 g nach Waschen mit Wasser und Filtration erhaltenem feuchtem Cellulofine GC-700-m (ein Produkt der Chisso Corp.) wurden 21,6 ml 1 N wässriges Natriumhydroxid und 12 ml Epichlorhydrin beigegeben. Die Mischung wurde bei 30°C während 4 Stunden vorsichtig geschüttelt, um dabei die Exoxidierung der auf der Oberfläche der Mikroporen vorhandenen hydrophilen Hydroxyl-Reste zu bewirken. Das exoxidierte Cellulofine wurde mit 500 ml destilliertem Wasser gewaschen, mit 6,7 ml Ethylendiamin und 1,05 ml 1 N wässrigen Natriumhydroxid bei 60°C während 2,5 Stunden umgesetzt, danach mit Wasser gewaschen und durch Filtration gesammelt. Zu 1 g des durch Saugfiltration gesammelten, mit Ethylendiamin gekoppelten Cellulofines wurden 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) und 1 ml 25%ige Glutaraldehyd-Lösung beigegeben, und die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt, mit Phosphatpuffer gewaschen und filtriert, womit ein Aldehydo-Cellulofine erhalten wurde.

Das Aldehydo-Cellulofine und 1500 IE Lipase MY wurden über Nacht in Phosphatpuffer umgesetzt, womit ein Präparat von in Cellulofine immobilisierter Lipase erhalten wurde.

Eine Substratlösung aus 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure, 2 ml Isooctan und 8 ml Phosphatpuffer wurde dem vorangehenden Präparat von immobilisiertem Enzym beigegeben, und die Reaktion wurde während 18 Stunden durchgeführt. Nach Ablauf der Reaktion wurde die Reaktionsmischung filtriert, und die gleiche Substratlösung wie im vorangehenden wurde dem wiedergewonnenen Präparat von immobilisiertem Enzym beigegeben und die Reaktion erneut durchgeführt.

Diese Vorgehensweise wurde insgesamt dreimal wiederholt. Das bei der dritten Umsetzung erhaltene Syntheseverhältnis betrug 94,0%.

Beispiel 39

Dowex MWA-1 (1 g) wurde mit destilliertem Wasser und 1/15 M McIlvaine-Puffer (pH 5,0) gewaschen. Dann wurden 0,2 ml (1500 IE) einer wässrigen Lösung von Lipase MY beigegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei 8°C geschüttelt, um die Adsorption zu bewirken, worauf 1 ml McIlvaine-Puffer und 80 µl 25%ige Glutaraldehyd-Lösung beigegeben wurden. Die Mischung wurde während 10 Minuten bei 8°C geschüttelt, um die Kopplung mit dem Ionenaustausch-Harz zu bewirken. Schliesslich wurden 0,2 ml 20%iges Natriumbisulfit beigegeben und die resultierende Mischung wurde während 10 Minuten bei 80°C geschüttelt, um das überschüssige Glutaraldehyd zu entfernen. Nach dem Waschen mit Wasser wurde ein Präparat von immobilisiertem Enzym erhalten.

Das vorangehende Präparat von immobilisiertem Enzym wurde einer Substratlösung aus 100 mg Cholesterin, 220 mg Ölsäure und 15 ml Isooctan beigegeben, und die Reaktion wurde während 18 Stunden durchgeführt. Nach Ablauf der Reaktion wurde die Reaktionsmischung filtriert, und die Reaktion wurde im gleichen Reaktionssystem wie bei der ersten Reaktion unter Verwendung des so wiedergewonnenen immobilisierten Enzyms erneut durchgeführt. Die Reaktion wurde insgesamt dreimal wiederholt.

Als Resultat betrug das bei der dritten Umsetzung erhaltene Syntheseverhältnis 96,5%.

Beispiel 40

1 g Octyl-Sepharose CL-4B (ein Produkt der Pharmacia Fine Chemicals), das aufgrund einer Modifikation der Agarose mit hydrophoben Octyl-Resten eine erhöhte Hydrophobizität aufwies, wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gut gewaschen und filtriert. Dann wurde eine Lösung von 3000 IE Lipase MY in 5 ml 0,05 M Phosphatpuffer beigegeben und bei 0°C während 1 Stunde vorsichtig geschüttelt, um die Adsorption des Enzyms auf der Octyl-Sepharose zu bewirken. Nach 1 Stunde wurde das Harz mit 1 ml Phosphatpuffer gewaschen, durch Filtration gesammelt und der Umsetzung unterzogen.

Die Reaktion wurde auf gleiche Weise wie im Beispiel 39 durchgeführt, ausser dass die Reaktionsdauer 16 Stunden betrug.

Nach 4 Wiederholungen der Reaktion betrug das bei der vierten Umsetzung erhaltene Syntheseverhältnis 94,8%.

Beispiel 41

Zu 1 g Celit wurden 2000 IE Lipase MY oder 1000 IE Cholesterin-Esterase T-18 und 5 ml Phosphatpuffer (pH 7,0) beigegeben, und die Mischung wurde bei Raumtemperatur während 1 Stunde geschüttelt, um die Adsorption zu bewirken. Nach 1 Stunde wurde das Celit durch Filtration entfernt, mit 1 ml Phosphatpuffer gewaschen, zum Reaktionsgefäss zusammen mit dem Filterpapier zurückgeführt und als immobilisiertes Enzym verwendet.

Die Reaktion wurde 5 Mal auf gleiche Weise wie im Beispiel 39 wiederholt, ausser dass die Reaktionsdauer 18 Stunden betrug. Bei der fünften Umsetzung betrug das erhaltene Syntheseverhältnis 94,1%, wenn als immobilisiertes Enzym Lipase MY verwendet wurde und 94,5%, wenn immobilisierte Cholesterin-Esterase verwendet wurde.

Beispiel 42

In diesem Beispiel wurde der Zusammenhang zwischen dem Syntheseverhältnis des Sterin-Esters und dem Rohstoffmengen-Verhältnis (Substratverhältnis) Fettsäure zu Sterin untersucht.

Dazu wurden 100 mg Cholesterin und eine spezifizierte Menge Methyl-Oleat verwendet, und eine Lösung von 1000 IE (33,3 mg) Lipase MY in 8 ml 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) wurde dem Reaktionssystem beigegeben. Die genannten Substrate wurden in 3,0 ml Isooctan gelöst, so dass das Reaktionssystem ein Zweiphasen-System Wasser – organisches Lösungsmittel war. Das verwendete Reaktionsgefäss war ein mit einer Schraubkappe versehener zylindrischer Glaskolben von 3 cm Innendurchmesser und 5 cm Höhe. In den nachfolgenden Beispielen sind die gleichen Angaben anwendbar, wenn nichts anderes spezifisch angegeben ist.

Das nach 2 Stunden Reaktionsdauer erhaltene Syntheseverhältnis des Cholesterin-Oleats ist in der nachfolgenden Tabelle 23 für jeden Lauf aufgeführt. Das Verhältnis wurde gemäss der folgenden Gleichung (2) berechnet:

Syntheseverhältnis (%) =

$$\frac{(\text{Peak-Fläche für Cholesterin-Oleat})}{(\text{Peak-Fläche für Cholesterin-Oleat} + \text{Peak-Fläche für Cholesterin})} \times 100$$

In den nachfolgenden Beispielen wurde das Syntheseverhältnis unter Verwendung der vorstehenden Gleichung (2) berechnet, wenn nichts anderes angegeben ist.

Tabelle 23

Lauf Nr.	Menge Methyl-Oleat (Mol pro Mol Cholesterin)	Syntheseverhältnis (%)
1	1,0	41,9
2	1,5	45,3
3	2,0	63,4
4	3,0	69,1
5	4,0	71,6
6	5,0	74,0
7	6,0	98,3

Die Daten zeigen eine ansteigende Tendenz des Syntheseverhältnisses, wenn das Mol-Verhältnis Methyl-Oleat/Cholesterin ansteigt.

Beispiel 43

Die Reaktion wurde auf gleiche Weise wie im Beispiel 42 durchgeführt, ausser dass 100 mg Cholesterin, eine in Tabelle 24 spezifizierte Menge Methyl-Oleat, 2 ml Isooctan, 8 ml 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) und 500 IE Lipase MY verwendet wurden, und dass die Reaktionsdauer 6 Stunden betrug. Die erhaltenen Resultate sind in der nachfolgenden Tabelle 24 aufgeführt. Da Cholesterin in grossem Überschuss verwendet wurde, wurde das Syntheseverhältnis gemäss der folgenden Gleichung (3) berechnet:

Syntheseverhältnis (%) =

$$\frac{(\text{Peak-Fläche für Cholesterin-Oleat})}{(\text{Peak-Fläche für Cholesterin-Oleat} + \text{Peak-Fläche für Cholesterin} + \text{Peak-Fläche für Ölsäure})} \times 100$$

Tabelle 24

Lauf Nr.	Menge Methyl-Oleat (Mol pro Mol Cholesterin)	Syntheseverhältnis (%)
1	1,0	81,2
2	0,8	81,1
3	0,7	82,2
4	0,6	87,0
5	0,5	89,3
6	0,4	90,3
7	0,3	90,2
8	0,2	94,4
9	0,1	97,3

Im Gegensatz zur Tabelle 23 zeigen die Daten der Tabelle 24, dass, wenn Cholesterin im Überschuss verwendet wird, das Syntheseverhältnis ansteigt, wenn die Menge Methyl-Oleat, also das Mol-Verhältnis Methyl-Oleat/Cholesterin sinkt. In

- (2) Anbetracht der Resultate dieses Beispiels und des Beispiels 42 kann geschlossen werden, dass jeder der beiden Substrate im Überschuss vorhanden sein kann und dass ein grösserer Unterschied in der Anzahl Mol zu einem grösseren Syntheseverhältnis führt.

Beispiel 44

In diesem Beispiel wurde das Syntheseverhältnis des gewünschten Esters in einem System mit einem wässrigen Medium und in einem System mit einem wässrigen organischen Lösungsmittel untersucht.

Dazu wurde das Reaktionsgefäss mit 100 mg Cholesterin, 230 mg Methyl-Oleat und 1000 IE Lipase MY geladen, dann wurden 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) und/oder Isooctan in den jeweiligen in Tabelle 25 aufgeführten Mengen beigegeben. Danach wurde die Reaktion während 4 Stunden durchgeführt. Die so erhaltenen Resultate werden in der nachfolgenden Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25

Lauf Nr.	Isooctan (ml)	Phosphatpuffer (ml)	Syntheseverhältnis (%)
1	0	10	59,5
2	1	9	96,8
3	2	8	97,3
4	3	7	93,4
5	4	6	78,2
6	5	5	55,5
7	6	4	64,4
8	7	3	25,3
9	8	2	51,2
10	9	1	85,4
11	10	0	21,1

Tabelle 25 zeigt, dass, wenn das Gesamtvolumen der Reaktionsmischung 10 ml beträgt, das Syntheseverhältnis bei einem Verhältnis Isooctan: Phosphatpuffer von etwa 2:8 ml ein Maximum erreicht. Bei einem System, das frei von Phosphatpuffer ist, findet die gewünschte Reaktion anscheinend als Resultat der Expression der Aktivität des Enzyms dank dem Wasser statt, das in den mit Wasser gesättigten Isooctan, Substraten und Enzym enthalten ist. In diesem Falle ist das Syntheseverhältnis niedrig, vermutlich weil das Enzym in der Reaktionsmischung als Feststoff verbleibt und Flocken bildet. Dem vermutlich an der Grenzfläche zwischen Wasser und hydrophoben Schicht wirksamen Enzym ist es daher anscheinend schwierig, eine genügende Kontaktfläche zu haben. Folglich steht im Vergleich zu anderen Reaktionsbedingungen eine so kleine Menge Wasser für die Hydrolyse des Fettsäure-Esters als Rohstoff zur Verfügung, dass diese Hydrolysereaktion für die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmend wird.

Beispiel 45

Die Reaktion wurde unter Verwendung von Isooctan und 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) in den in Tabelle 26 aufgeführten Mengen durchgeführt. Als Reaktionsgefäss diente ein Sakaguchi-Kolben von 500 ml. Die Reaktionsbedingungen waren die gleichen wie im Beispiel 44, ausser dass der Sakaguchi-Kolben auf einem Schüttler (ein Produkt der Iwashiy Bio-Science Co., Ltd.) mit einem Hub von 6 cm und einer Frequenz von 120 Perioden pro Minute geschüttelt wurde. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 26 angegeben.

Tabelle 26 zeigt, dass dieses System eine sinkende Tendenz des Syntheseverhältnisses aufweist, wenn das Gesamtvolumen der Reaktionsmischung steigt, und dass das Verhältnis steigt, wenn die Proportionen von Phosphatpuffer im Reaktionssystem steigen, und zwar unabhängig vom Volumen der Reaktionsmischung.

Tabelle 26

Lauf Nr.	Gesamtvolumen (ml)	Isooctan/Phosphat-Puffer-Volumen-verhältnis	Syntheseverhältnis (%)
1	30	4/1	54,4
2	30	3/2	91,4
3	30	2/3	95,1
4	30	1/4	96,2
5	60	4/1	68,9
6	60	3/2	88,5
7	60	2/3	93,4
8	60	1/4	95,7
9	100	4/1	64,7
10	100	3/2	80,1
11	100	2/3	88,3
12	100	1/4	94,1
13	200	4/1	40,7
14	200	3/2	56,1
15	200	2/3	82,6
16	200	1/4	89,7
17	300	4/1	16,5

Tabelle 26 (Fortsetzung)

Lauf Nr.	Gesamtvolumen (ml)	Isooctan/Phosphat-Puffer-Volumen-verhältnis	Syntheseverhältnis (%)
18	300	3/2	35,7
19	300	2/3	76,2
20	300	1/4	78,1

Beispiel 46

In diesem Beispiel wurde, um das gewünschte Cholesterin-Oleat zu erhalten, die Reaktion in einem System mit einem wässrigen Medium durchgeführt (in welchem einzig 0,05 M Phosphatpuffer [pH 7,0] ohne organisches Lösungsmittel verwendet wurde), wobei 1000 IE Lipase MY sowie als Substrat Cholesterin und Methyl-Oleat in den jeweiligen in Tabelle 27 aufgeführten Mengen verwendet wurden (wobei das Mol-Verhältnis Cholesterin/Methyl-Oleat konstant bei 1:2 blieb). Die so erhaltenen Resultate werden in der nachfolgenden Tabelle 27 aufgeführt.

Bei den Systemen, bei welchen 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) in einer Menge von 0,5 ml verwendet wurde, wurde eine Glaskugel von 12 mm Durchmesser in das Reaktionsgefäß gelegt, um die Vermischung zu verbessern.

In Tabelle 27 sind auch Synthesemengen von Cholesterin-Oleat aufgeführt, die berechnet wurden, indem eine Konversionstabelle Fläche-zu-Gewicht verwendet wurde, die unter Verwendung von Normlösungen von Cholesterin-Oleat aufgestellt worden war.

Tabelle 27

Lauf Nr.	Cholesterin (mg)	Methyl-Oleat (mg)	Phosphat-Puffer (ml)	Zeitdauer (h)	Syntheseverhältnis (%)	Menge Cholesterin-Oleat (mg)
1	100	153	0,5	23	94,8	141
2	100	153	8,0	23	70,3	97
3	100	153	20,0	23	88,8	126
4	200	307	0,5	23	75,4	210
5	800	1227	0,5	48	30,4	392
6	800	1227	8,0	48	88,2	996
7	800	1227	20,0	48	75,1	836
8	1000	1534	8,0	48	85,8	1200
9	1000	1534	20,0	48	83,3	1157
10	1200	1840	8,0	48	84,5	1412
11	1200	1840	20,0	48	80,7	1344
12	1400	2147	8,0	48	80,8	1571
13	1400	2147	20,0	48	79,8	1554
14	1600	2454	8,0	160	84,4	1880
15	1600	2454	20,0	160	93,6	2197
16	1800	2760	8,0	160	86,9	2196
17	1800	2760	20,0	160	91,7	2376
18	2000	3067	8,0	160	84,4	2350
19	2000	3067	20,0	160	83,7	2330

Beispiel 47

In diesem Beispiel wurden Änderungen des Syntheseverhältnisses in Abhängigkeit von der Art des Lösungsmittels untersucht, indem man die Reaktion unter Verwendung eines Systems aus 100 mg Cholesterin, 230 mg Methyl-Oleat, 500 IE Lipase MY und einem Verhältnis 2:8 ml vom organischen Lösungsmittel zum 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) während 29 Stunden durchführte. Die verwendeten organischen Lösungsmittel sowie die erhaltenen Resultate sind in der nachfolgenden Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 28

Lauf Nr.	Verwendetes organisches Lösungsmittel	Syntheseverhältnis (%)
1	Isooctan	99,0
2	Cyclohexan	99,5
3	n-Hexadecan	69,5

Beispiel 48

In diesem Beispiel wurden Änderungen des Syntheseverhältnisses in Abhängigkeit von der Zeit untersucht, indem man die Reaktion unter Verwendung eines Systems aus 100 mg Cholesterin, 230 mg Methyl-Oleat, 1000 IE Lipase MY und einem Verhältnis 5:5 ml bis 1:9 ml vom Isooctan zum 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) durchführte. Die erhaltenen Resultate sind in der nachfolgenden Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29

Lauf Nr.	Reaktionsdauer (h)	Isooctan-Phosphat-Puffer (ml/ml)	Syntheseverhältnis (%)
1	0,5	5/5	1,0
2	0,5	4/6	2,6
3	0,5	3/7	4,6
4	0,5	2/8	17,0
5	0,5	1/9	47,5
6	1,0	5/5	4,2
7	1,0	4/6	8,5
8	1,0	3/7	12,1
9	1,0	2/8	33,1
10	1,0	1/9	64,4
11	2,0	5/5	15,9
12	2,0	4/6	32,5
13	2,0	3/7	57,5
14	2,0	2/8	65,8
15	2,0	1/9	96,6
16	3,0	5/5	33,1
17	3,0	4/6	47,0
18	3,0	3/7	66,7
19	3,0	2/8	88,6
20	3,0	1/9	95,6
21	4,0	5/5	54,8
22	4,0	4/6	77,8
23	4,0	3/7	93,3
24	4,0	2/8	97,2
25	4,0	1/9	96,8
26	5,0	5/5	90,5
27	5,0	4/6	89,6
28	5,0	3/7	94,1
29	5,0	2/8	97,5
30	5,0	1/9	96,6
31	6,0	5/5	92,6

Tabelle 29 (Fortsetzung)

32	6,0	4/6	95,2
33	6,0	3/7	95,6
34	6,0	2/8	97,2
35	6,0	1/9	96,2
36	16,0	5/5	94,6
37	16,0	4/6	96,2
38	16,0	3/7	97,3
39	16,0	2/8	97,3
40	16,0	1/9	96,3

Die Daten der Tabelle 29 zeigen, dass auch in Systemen Isooctan/Phosphatpuffer, bei denen die Reaktionsgeschwindigkeit niedrig ist, ein Syntheseverhältnis von 95% erreicht werden kann, wenn man die Reaktionsdauer verlängert.

Beispiel 49

Die Reaktion wurde durchgeführt, indem 100 mg Cholesterin und eine in Tabelle 30 angegebene spezifizierte Menge eines Fettsäure-Methyl-Esters, ein Enzym sowie Isooctan/0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) verwendet wurden. Die Reaktionsdauer und die erhaltenen Resultate sind ebenfalls in Tabelle 30 aufgeführt. Das Syntheseverhältnis wurde gemäss der folgenden Gleichung (4) berechnet:

$$\text{Syntheseverhältnis (\%)} = \quad (4)$$

$$\frac{(\text{Peak-Fläche für Cholesterin-Ester})}{(\text{Peak-Fläche für Cholesterin-Ester} + \text{Peak-Fläche für Cholesterin})} \times 100$$

Die in Tabelle 30 verwendeten Symbole sind entweder wie im vorangehenden oder wie folgt definiert:

35	Fettsäure-Ester
C-1	Methyl-Propionat
C-2	Methyl-Caprinat
C-3	Methyl-Stearat
40	C-4 Methyl-Behenat
C-5	Methyl-Oleat
C-6	Methyl-Ester von Lanolin-Fettsäuren (ein Produkt der Yoshikawa Oil and Fat Co., Ltd.)
C-7	Methyl-Isostearat (aus dem Isostearinsäure-Produkt der Emery Industries Inc. hergestellt)
45	C-8 Methyl-Linoleat
C-9	Methyl-12-Hydroxystearat
C-10	Dimethyl-Succinat

Tabelle 30

Lauf Nr.	Enzym (IE)	Fettsäure-Ester Molverhältnis zu Cholesterin	Isooctan/Phosphat-Puffer (ml/ml)	Reaktionsdauer (h)	Syntheseverhältnis (%)
1	E-1 (1000)	C-1 (1,2)	2/8	120	43,3
2	E-1 (1000)	C-2 (1,2)	2/8	24	94,7
3	E-1 (1000)	C-3 (1,2)	2/8	24	80,4
4	E-1 (1000)	C-4 (1,2)	2/8	24	69,4
5	E-1 (1000)	C-5 (1,2)	2/8	24	97,3
6	E-1 (1000)	C-6 (1,2)	2/8	48	82,2
7	E-1 (1000)	C-7 (1,2)	2/8	24	74,6
8	E-1 (1000)	C-8 (1,2)	2/8	24	92,7
9	E-2 (1000)	C-2 (1,2)	2/8	120	78,2
10	E-2 (1000)	C-3 (1,2)	2/8	48	92,2
11	E-2 (1000)	C-4 (1,2)	2/8	48	74,2
12	E-2 (1000)	C-5 (2,0)	3/8	21	84,5
13	E-2 (1000)	C-7 (1,2)	2/8	48	85,5

Tabelle 30 (Fortsetzung)

Lauf Nr.	Enzym (IE)	Fettsäure-Ester Molverhältnis zu Cholesterin	Isooctan/Phosphat-Puffer (ml/ml)	Reaktionsdauer (h)	Syntheseverhältnis (%)
14	E-2 (1000)	C-8 (1,2)	2/8	48	92,9
15	E-2 (1000)	C-9 (1,2)	2/8	120	63,0
16	E-3 (1000)	C-3 (1,2)	2/8	48	62,4
17	E-3 (1000)	C-4 (1,2)	2/8	96	71,3
18	E-3 (1000)	C-5 (2,0)	3/8	45	89,9
19	E-3 (1000)	C-10 (1,2)	2/8	120	65,3
20	E-7 (1000)	C-3 (1,2)	2/8	96	75,9
21	E-7 (1000)	C-5 (1,2)	2/8	96	88,3
22	E-7 (1000)	C-6 (1,2)	2/8	72	50,5
23	E-7 (1000)	C-8 (1,2)	2/8	120	69,7
24	E-5 (350)	C-5 (2,0)	3/8	2	96,8
25	E-6 (500)	C-5 (2,0)	2/8	3	97,4

Beispiel 50

Die Reaktion wurde durchgeführt, indem 100 mg einer in Tabelle 31 angegebenen Sterin-Komponente, Methyl-Oleat (in einem Mol-Verhältnis von 1,2 zum Cholesterin), 1000 IE Lipase MY sowie Isooctan-Phosphatpuffer im Verhältnis 2:8 ml vom Isooctan zum 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) verwendet wurden. Die Reaktionsdauer und die erhaltenen Resultate sind ebenfalls in Tabelle 31 aufgeführt. Das Syntheseverhältnis wurde gemäss der folgenden Gleichung (5) berechnet:

$$\text{Syntheseverhältnis (\%)} = \frac{(\text{Peak-Fläche für Sterin-Ester})}{(\text{Peak-Fläche für Sterin-Ester} + \text{Peak-Fläche für Sterin})} \times 100$$

Tabelle 31

Lauf Nr.	Sterin-Komponente	Reaktionsdauer (h)	Syntheseverhältnis (%)
1	Cholesterin	24	92,2
2	β -Sitosterin	24	89,7
3	Stigmasterin	24	95,4
4	Ergosterin	24	94,0
5	Dihydrocholesterin	72	93,1

Beispiel 51

Die Reaktion wurde während 70 Stunden durchgeführt, indem als Substrate 100 mg Cholesterin und 200 mg eines in Tabelle 32 angegebenen Fettsäure-Esters als Ausgangsstoff zusammen mit 1000 IE Lipase MY in einem Isooctan-Phosphatpuffer-Lösungsmittel im Verhältnis 5:10 ml vom Isooctan zum 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) verwendet wurden. Das auf gleiche Weise wie im Beispiel 42 berechnete Syntheseverhältnis ist in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32

Lauf Nr.	Fettsäure-Ester als Ausgangsstoff	Syntheseverhältnis (%)
1	Methyl-Palmitat	99,2
2	Ethyl-Palmitat	98,3
3	Isopropyl-Palmitat	98,7

Tabelle 32 (Fortsetzung)

Lauf Nr.	Fettsäure-Ester als Ausgangsstoff	Syntheseverhältnis (%)
4	Isobutyl-Palmitat	97,4
5	Methyl-Stearat	97,6

Beispiel 52

Die Reaktion wurde während 1,5 Stunden durchgeführt, indem als Substrate 100 mg Cholesterin und eine in Tabelle 33 angegebene Menge Olivenöl zusammen mit 500 IE Lipase MY in einem Isooctan-Phosphatpuffer-Lösungsmittel im Verhältnis 2:8 ml vom Isooctan zum 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) verwendet wurden. In allen Reaktionsläufen wurde das Olivenöl in 1,5 Stunden vollständig hydrolisiert. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 33 aufgeführt. Das Syntheseverhältnis wurde für die Läufe Nr. 1 und 2 gemäss der vorangehenden Gleichung (2) und das Syntheseverhältnis für die Läufe Nr. 3 bis 5 gemäss der nachfolgenden Gleichung (6) berechnet:

$$\text{Syntheseverhältnis (\%)} = \frac{(\text{Peak-Fläche für Cholesterin-Oleat})}{(\text{Peak-Fläche für Cholesterin-Oleat} + \text{Peak-Fläche für Fettsäure})} \times 100$$

Tabelle 33

Lauf Nr.	Olivenöl (mg)	Syntheseverhältnis (%)
1	299	96,6
2	114,5	94,5
3	76,3	96,3
4	57,2	97,1
5	45,8	97,5

Beispiel 53

Die Reaktion wurde durchgeführt, indem als Substrate 100 mg Cholesterin und spezifizierte Mengen eines in Tabelle 34 angegebenen Öls oder Fetts zusammen mit 1000 IE Lipase MY verwendet wurden. Das Reaktionssystem, die

Reaktionsdauer und die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 34 aufgeführt. Das Syntheseverhältnis wurde gemäss der vorangehenden Gleichung (2) berechnet.

Tabelle 34

Lauf Nr.	Öl oder Fett (mg)	Isooctan/ Phosphat- puffer (ml/ml)	Reaktions- dauer (h)	Synthese- verhältnis (%)
1	Rizinusöl (240)	2/8	96	61,4
2	Rizinusöl (240)	10/15	96	73,8
3	Hydrogeniertes Rizinusöl (235)	2/8	45	62,3
4	Hydrogeniertes Rizinusöl (235)	10/15	45	59,6

Beispiel 54

Die Reaktion wurde durch 3 Stunden langes Rühren einer Mischung aus 100 mg Cholesterin, 153 mg Methyl-Oleat, 2 ml Isooctan, 8 ml 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) und 1000 IE Lipase MY durchgeführt. Dann wurde aus der oberen Schicht eine Probe entnommen und auf das Syntheseverhältnis von Cholesterin-Oleat untersucht.

Danach wurde die Mischung stehengelassen, die obere Isooctan-Schicht ohne die mit der wässrigen Schicht in Kontakt stehende Grenzschicht entfernt, und es wurden 16 ml Isooctan erneut beigegeben. Nach Rühren und Stehenlassen wurden 15 ml Isooctan entfernt, um dadurch die in der Grenzschicht vorhandenen nicht umgesetzten Substrate und Reaktionsprodukt wegzuwaschen. Nach insgesamt zweimaliger Wiederholung der vorangehenden Vorgehensweise wurden der Enzym enthaltenden wässrigen Schicht erneut 100 mg Cholesterin, 153 mg Methyl-Oleat und 1 ml Isooctan beigegeben und die Reaktion wurde während 3 Stunden durchgeführt.

In Ausübung der Erfindung wurde die vorangehende Vorgehensweise, umfassend das auf die Umsetzung folgende Entfernen der oberen, Substrate und Reaktionsprodukt enthaltenden Isooctan-Schicht ohne die wässrige, Lipase enthaltende Schicht und die Grenzschicht, und dann das Beigeben von neuen Portionen von Substraten und Isooctan, insgesamt 7 Mal wiederholt.

Die so erhaltenen Resultate sind in Tabelle 35 aufgeführt. Während der Zeitdauer von der Untersuchung des Syntheseverhältnisses bis zur Beigabe von neuen Portionen von Substraten wurde die Reaktionsmischung in einem Zustand gehalten, bei welchem das Enzym und die Substrate miteinander in Kontakt blieben.

Tabelle 35

Wiederholter Reaktionslauf Nr.	Syntheseverhältnis (%)
1	96,0
2	91,4
3	90,4
4	91,1
5	92,3
6	90,5
7	89,6

Die Daten in Tabelle 35 zeigen, dass die Wiederholung der vorangehenden Synthesereaktion zu überhaupt keinem Verlust von Enzymaktivität führt.

Beispiel 55

Die Vorgehensweise des Beispiels 21 wurde unter Verwendung von 230 mg Methyl- α -Hydroxypalmitat anstelle von α -Hydroxypalmitinsäure wiederholt.

Das Syntheseverhältnis betrug in der ersten Reaktion 72,5% und in der zweiten Reaktion 70,4%.

Beispiel 56

Es wurde die im Flussdiagramm der Fig. 6 dargestellte Apparatur zur kontinuierlichen Umsetzung verwendet, der Teil (G2) der Kolonne wurde mit 500 ml einer 108 IE/ml Lösung von Lipase MY in 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gefüllt, und eine aus Cholesterin/Methyl-Oleat/Isooctan bestehende Substratlösung (im Verhältnis 1200 mg: 1840 mg: 600 ml) wurde in den die wässrige Enzymlösung enthaltenden Schichtteil (G2) eingeleitet, und zwar in Form von kleinen öligen Tröpfchen mit einer Fließgeschwindigkeit von 8,52 ml/Minute mittels der Pumpe (P1) durch die am Boden der Kolonne angeordnete Düse (N1). Die aus dem oberen Teil (G1) der Glaskolonne entzogene, das Reaktionsprodukt enthaltende Isooctan-Schicht wurde kontinuierlich entzogen und mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,127 ml/Minute in den Tank für die Reaktionsmischung (T4) eingeleitet. Die aus dem Auffangsbehälter (T1) überlaufende Isooctanlösung wurde in das Mischgefäß (T2) eingeleitet und mit einer neuen Substratlösung von gleicher Zusammensetzung wie im vorangehenden gemischt, wobei diese Substratlösung aus dem Rohstofftank (T3) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,127 ml/Minute mittels der Pumpe (P3) zugeleitet wurde. Die resultierende Substratlösung wurde erneut mit einer Fließgeschwindigkeit von 8,52 ml/Minute in den Teil (G2) der Glaskolonne mittels der Pumpe (P1) durch die Düse (N1) hindurch eingeleitet.

Auf diese Weise wurde die Substratlösung durch die wässrige Enzymlösung hindurch mehrmals rezykliert, während in 3-stündigen Zeitabständen Proben aus der Reaktionsmischung vom automatischen Probensammler (A) entnommen wurden. Die Resultate der Untersuchung der Proben in bezug auf das Syntheseverhältnis des Esters sind in Fig. 9 dargestellt, die auf gleiche Weise wie Fig. 7 erhalten wurde.

Bis 48 Stunden nach Beginn der Reaktion befand sich die Isooctan-Schicht im oberen Teil (G1) der Glaskolonne in einem emulgierten Zustand. Phasentrennung begann jedoch mit dem Ablauf der Umsetzung, und sie war nach etwa 64 Stunden vollständig.

Fig. 9 zeigt, dass, wenn man die vorangehende Vorgehensweise befolgt, der gewünschte Ester unter wiederholter Verwendung des Enzyms kontinuierlich synthetisiert und das Syntheseverhältnis auf nicht weniger als 80% gehalten werden kann, ohne dass man das Enzym während 240 Stunden oder noch mehr auswechseln oder nachfüllen muss.

Beispiel 57

Ein Reaktionsgefäß wurde mittels Duraguard 2500 in zwei Räume unterteilt. Der untere Raum (Kapazität 8 cm³) unterhalb dieser Membran wurde mit 8 cm³ einer wässrigen Lösung von Lipase MY mit einer Enzymkonzentration von 595 IE/ml gefüllt. Ein mit diesem Raum verbundenes Verbindungsrohr war ebenfalls mit der gleichen wässrigen Enzymlösung gefüllt, so dass der Flüssigkeitspegel in diesem Rohr etwa 30 cm höher stand als die Membran.

Der obere Raum des vorgenannten Gefäßes wurde mit einer Substratlösung geladen, die aus 1000 mg Cholesterin, 152 mg Methyl-Oleat und 10 ml Isooctan bestand. Die Reaktion wurde während 48 Stunden durchgeführt, während das gesamte Gefäß auf einem Schüttler mit einem Hub von 6 cm und einer Frequenz von 120 Perioden pro Minute geschüttelt wurde. Als Resultat wurde ein Syntheseverhältnis von 87,2%

erhalten. Das Reaktionssystem war nicht emulgiert. Es wurde kein Eindringen von Wasser in die Substratphase beobachtet.

Beispiel 58

Duraguard 2500 wurde in Methanol und in Wasser eingetaucht, um dadurch die Membran als Resultat der Substitution des Inhalts der Mikroporen durch Wasser hydrophil zu machen. Diese hydrophile Membran wurde anstelle der im Beispiel 57 verwendeten Membran Duraguard 2500 verwendet. Die von der Membran getrennten Räume wurden jeweils mit der gleichen Substratlösung und wässrigen Enzymlösung wie im vorangehenden geladen. Bei diesem Beispiel stand jedoch der Flüssigkeitspegel im Verbindungsrohr gleich hoch wie die Membran.

Die Reaktion wurde auf gleiche Weise wie im Beispiel 57 durchgeführt, und als das Syntheseverhältnis 90% oder mehr erreichte, wurde die Substratlösung ersetzt. Die Reaktion wurde auf diese Weise insgesamt 10 Mal wiederholt. Das Syntheseverhältnis und die Menge Cholesterin-Oleat wurden bei jedem Lauf bestimmt.

Die erhaltenen Resultate sind in Fig. 10 dargestellt. In dieser Figur wird auf der Abszisse die Reaktionsdauer (h) und auf der Ordinate die Menge Cholesterin-Oleat (mg) angegeben.

Fig. 10 zeigt, dass wenn eine hydrophile Membran verwendet wird, die wässrige Enzymlösung durch die Mikroporen der Membran hindurch tritt und mit den Substraten im oberen Teil der Membran in Kontakt kommt, um dort die Reaktion zu katalysieren, so dass die Reaktion weitergeführt werden kann, ohne dass man das Enzym während 500 Stunden oder noch mehr auswechseln oder nachfüllen muss, und nach 500 Stunden 1280 mg Cholesterin-Oleat liefert.

Beispiel 59

Die Vorgehensweise vom Beispiel 57 wurde unter Verwendung von 5 Arten von Membranen wie in Tabelle 36 dargestellt befolgt. Das Volumen des unteren Raumes betrug 8 cm³. Die Reaktion wurde auf gleiche Weise wie im Beispiel 57 durchgeführt. Die so erhaltenen Resultate sind ebenfalls in Tabelle 36 dargestellt.

Tabelle 36

Lauf Nr.	1	2	3	4	5
Membranmaterial	Regenerierte Cellulose	Teflon	Nitrocellulose	Nitrocellulose	(*)
Mittlere Porengrösse (µm)	0,45	0,5	0,45	3,0	0,1
Höhenunterschied zwischen Verbindungsrohr und Membran (cm)	0	30	0	0	0
Reaktionsdauer (h)	48	48	48	48	48
Syntheseverhältnis (%)	90,4	85,6	90,3	92,6	93,2
Emulgierung	keine	keine	keine	keine	keine

(*) Im Beispiel 58 erhaltene hydrophile Membran

Tabelle 36 zeigt, dass die Synthesereaktion mit jeder Membran ohne Emulgierung des Reaktionssystems gleichmässig abläuft.

Beispiel 60

Eine Glaskolonne von 2 cm Innendurchmesser und 46 cm Länge wurde bis zu einer Höhe von etwa 36 cm mit 900 000 IE (30 g) von auf gleiche Weise wie in der Vorgehensweise (2) des Beispiels 31 immobilisierter Lipase MY geladen. Eine aus 1000 mg Cholesterin, 1534 mg Methyl-Oleat und 150 ml Isooctan bestehende Substratlösung wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 6,3 ml/Minute durch die Kolonne durchgeleitet. Als das Syntheseverhältnis vom Cholesterin-Oleat etwa 80% erreichte, wurde die Substratlösung mit einer frischen Substratlösung ersetzt und die Reaktion wiederholt.

Wie im Beispiel 46 (Tabelle 27) wurde das bei jedem Lauf erhaltene Syntheseverhältnis in die Synthesemenge von Cholesterin-Oleat umgerechnet und der Zusammenhang zwischen dieser Menge und der Reaktionsdauer untersucht. Die Resultate sind in Fig. 11 auf gleiche Weise wie in Fig. 10 dargestellt.

Beispiel 61

Zu 2000 IE (19,0 mg) der immobilisierten Cholesterin-Esterase T-18 wurden 100 mg Cholesterin, 153 mg Methyl-Oleat und 15 ml Isooctan beigegeben, und die Reaktion wurde durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde einmal täglich ausser an Feiertagen filtriert und die Reaktion wurde im gleichen Reaktionssystem wie beim ersten Lauf unter Verwendung des so wiedergewonnenen immobilisierten Enzyms

während weiteren 79 Tagen wiederholt, wobei die Substratlösung jeden Tag durch eine frische Lösung ersetzt wurde. Der Zeitablauf der Reaktion am 80. Tag wird in Tabelle 37 dargestellt.

Tabelle 37

Reaktionsdauer (h)	Syntheseverhältnis (%)
1	29,4
3	72,1
5	81,9
18	84,6
23	91,7

Beispiel 62

Jedem auf gleiche Weise wie im Beispiel 36 hergestellten Präparat von immobilisiertem Enzym wurden 100 mg Cholesterin, 230 mg Methyl-Oleat, 2 ml Isooctan und 8 ml 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) beigegeben, und die Reaktion wurde während 24 Stunden durchgeführt. Nach Ablauf der Reaktion wurde die Reaktionsmischung filtriert, das so als Kuchen gewonnene immobilisierte Enzym wurde zum gleichen Reaktionsgefäss zusammen mit dem Filterpapier zurückgeführt und die Reaktion wurde im gleichen Reaktionssystem wie im vorangehenden wiederholt. Diese Vorgehensweise wurde insgesamt dreimal wiederholt. Das bei der dritten Umsetzung erhaltene Syntheseverhältnis ist in der

nachfolgenden Tabelle 38 für jedes Präparat von immobilisiertem Enzym dargestellt.

Tabelle 38

Lauf Nr.	Enzympräparat	Syntheseverhältnis bei der 3. Umsetzung (%)
1	in Glutaraldehydo-Celit immobilisiertes Enzym	78,9
2	in Carbodiimido-Celit immobilisiertes Enzym	54,6
3	in Glutaraldehydo-Glas immobilisiertes Enzym	70,6
4	in Carbodiimido-Glas immobilisiertes Enzym	65,4

Beispiel 63

Dem auf gleiche Weise wie im Beispiel 38 hergestellten Präparat von immobilisiertem Enzym wurde eine Substratlösung aus 100 mg Cholesterin, 230 mg Methyl-Oleat, 2 ml Isooctan und 8 ml 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) beigegeben, und die Reaktion wurde während 24 Stunden durchgeführt. Nach Ablauf der Reaktion wurde die Reaktionsmischung filtriert, dem wiedergewonnenen Präparat vom immobilisiertem Enzym wurde die gleiche Substratlösung wie im vorangehenden beigegeben, und die Reaktion wurde erneut durchgeführt.

Diese Vorgehensweise wurde dreimal wiederholt. Das bei der dritten Umsetzung erhaltene Syntheseverhältnis betrug 95,2%.

Beispiel 64

Unter Verwendung von jeweils in Tabelle 39 angegebenen spezifizierten Mengen eines Enzyms, einer Alkohol-Komponente und einer Fettsäure- oder Fettsäure-Ester-Komponente wurde die Reaktion in 3:8 ml Isooctan und 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) durchgeführt. Die Reaktionsdauer und das erhaltene Resultat sind in derselben Tabelle angegeben.

Die in Tabelle 39 verwendeten Symbole sind entweder wie im vorangehenden oder wie folgt definiert:

Fettsäure-Ester

C-11	Triolein (ein Produkt der Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.)
C-12	Tristearin (ein Produkt der Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.)
C-13	Trilaurin (ein Produkt der Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.)
C-14	Tributylin (ein Produkt der Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.)
C-15	Sojabohnenöl
C-16	Talg
C-17	Baumwollsaamenöl
C-18	Olivöl

Tabelle 39 (Fortsetzung)

Lauf Nr.	Enzym	Alkohol	Fettsäure oder Fettsäure-Ester	Reak- tions- dauer	Synthese- verhältnis
5	(IE)	(mg)	(mg)	(h)	(%)
	4 E-1 (1000)	A-10 (69,7)	B-1 (147)	24	99,3
	5 E-1 (1000)	A-7 (51,8)	C-5 (153)	120	75,4
10	6 E-1 (1000)	A-8 (78,1)	C-2 (96,3)	3	89,5
	7 E-1 (1000)	A-8 (78,1)	C-3 (154)	3	86,6
	8 E-1 (1000)	A-8 (78,1)	C-5 (153)	3	99,1
	9 E-1 (1000)	A-9 (90,5)	C-2 (96,3)	5	85,4
10	E-1 (1000)	A-9 (90,5)	C-5 (153)	5	89,7
15	11 E-1 (1000)	A-10 (69,7)	C-3 (154)	24	93,3
	12 E-1 (1000)	A-10 (69,7)	C-5 (153)	3	95,8
	13 E-1 (1000)	A-1 (100)	C-11 (229)	3	96,4
	14 E-1 (1000)	A-1 (100)	C-12 (231)	3	92,2
	15 E-1 (1000)	A-1 (100)	C-13 (165)	3	89,3
20	E-1 (1000)	A-1 (100)	C-14 (78,2)	24	83,6
	17 E-1 (1000)	A-1 (100)	C-15 (226)	3	92,0
	18 E-1 (1000)	A-1 (100)	C-16 (222)	3	94,4
	19 E-1 (1000)	A-1 (100)	C-17 (224)	3	95,2
	20 E-4 (66,7)	A-1 (100)	B-1 (147)	3	96,6
25	21 E-6 (6,7)	A-1 (100)	C-5 (153)	3	94,6
	22 E-4 (66,7)	A-1 (100)	C-5 (153)	24	95,4
	23 E-6 (6,7)	A-1 (100)	C-18 (227)	1	97,5
	24 E-4 (66,7)	A-1 (100)	C-18 (227)	3	97,4
	25 E-6 (6,7)	A-1 (100)	B-12 (147)	24	86,7
30	26 E-4 (66,7)	A-1 (100)	B-12 (147)	5	90,8
	27 E-1 (1000)	A-10 (69,7)	B-6 (159)	40	91,4
	28 E-1 (1000)	A-10 (69,7)	B-12 (147)	40	90,4
	29 E-1 (1000)	A-8 (78,1)	B-6 (159)	40	96,2
	30 E-7 (1000)	A-8 (78,1)	B-6 (159)	112	73,1
35	E-1 (1000)	A-8 (78,1)	B-12 (147)	40	94,8
	32 E-7 (1000)	A-8 (78,1)	B-12 (147)	112	73,6
	33 E-8 (1000)	A-8 (78,1)	B-1 (147)	24	83,0
	34 E-6 (6,7)	A-8 (78,1)	B-1 (147)	1	99,7
	35 E-4 (66,7)	A-8 (78,1)	B-1 (147)	1	99,8
40	36 E-6 (6,7)	A-8 (78,1)	C-5 (153)	1	96,1
	37 E-4 (66,7)	A-8 (78,1)	C-5 (153)	1	96,0
	38 E-6 (6,7)	A-8 (78,1)	C-18 (227)	1	99,5
	39 E-4 (66,7)	A-8 (78,1)	C-18 (227)	1	99,8
	40 E-6 (6,7)	A-8 (78,1)	B-12 (147)	24	93,7
45	41 E-4 (66,7)	A-8 (78,1)	B-12 (147)	1	96,0
	42 E-6 (6,7)	A-8 (78,1)	B-6 (159)	24	94,8
	43 E-4 (66,7)	A-8 (78,1)	B-6 (159)	24	88,2
	44 E-1 (1000)	A-1 (100)	B-14 (216)	1,5	93,2
	45 E-8 (1000)	A-8 (78,1)	C-18 (227)	48	93,1
50	46 E-8 (1000)	A-8 (78,1)	B-12 (147)	48	86,9
	47 E-6 (6,7)	A-1 (100)	B-6 (159)	48	72,8
	48 E-9 (13,3)	A-8 (78,1)	B-8 (138)	94	61,5
	49 E-9 (13,3)	A-8 (78,1)	B-1 (146)	122	64,4
	50 E-6 (6,7)	A-6 (100)	B-1 (146)	122	92,1
55	51 E-6 (6,7)	A-6 (100)	C-18 (227)	122	81,6

Tabelle 39

Lauf Nr.	Enzym (IE)	Alkohol (mg)	Fettsäure oder Fettsäure-Ester (mg)	Reaktionsdauer (h)	Syntheseverhältnis (%)
1	E-1 (1000)	A-7 (51,8)	B-1 (147)	24	76,4
2	E-1 (1000)	A-8 (78,1)	B-1 (147)	1	99,3
3	E-1 (1000)	A-9 (90,5)	B-1 (147)	3	94,5

Beispiel 65

Eine Mischung von 10 g Dihydrocholesterin, 11 g Ölsäure, 333 mg (10 000 IE) Lipase MY und 5 ml Cyclohexan wurde bei 200 Umdrehungen pro Minute während 64 Stunden gerührt.

Das nach 40 Stunden Reaktionsdauer bestimmte Syntheseverhältnis betrug 73,1% und nach 64 Stunden betrug das Syntheseverhältnis 83,1%.

Nach Ablauf der Reaktion wurde die Reaktionsmischung

mit wässrigem Methanol extrahiert, um die nicht umgesetzten Dihydrocholesterin und Ölsäure zu entfernen. Das

Entfernen der Cyclohexanschicht durch Destillation ergab 12,40 g vom gewünschten Dihydrocholesterin-Ölsäure-Ester.

FIG. 1

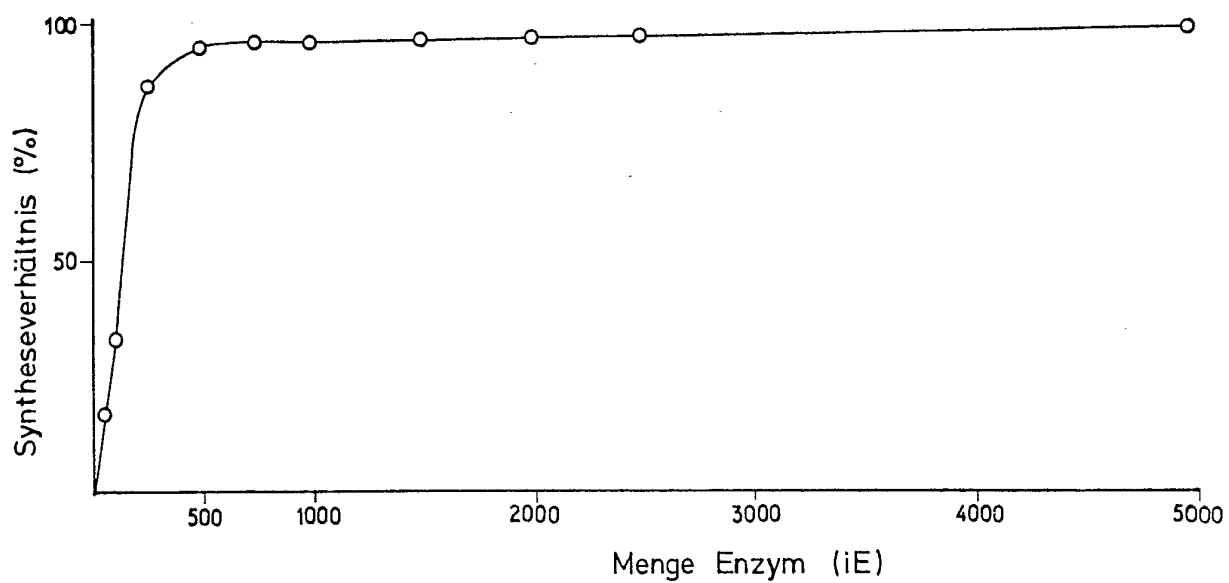


FIG. 2

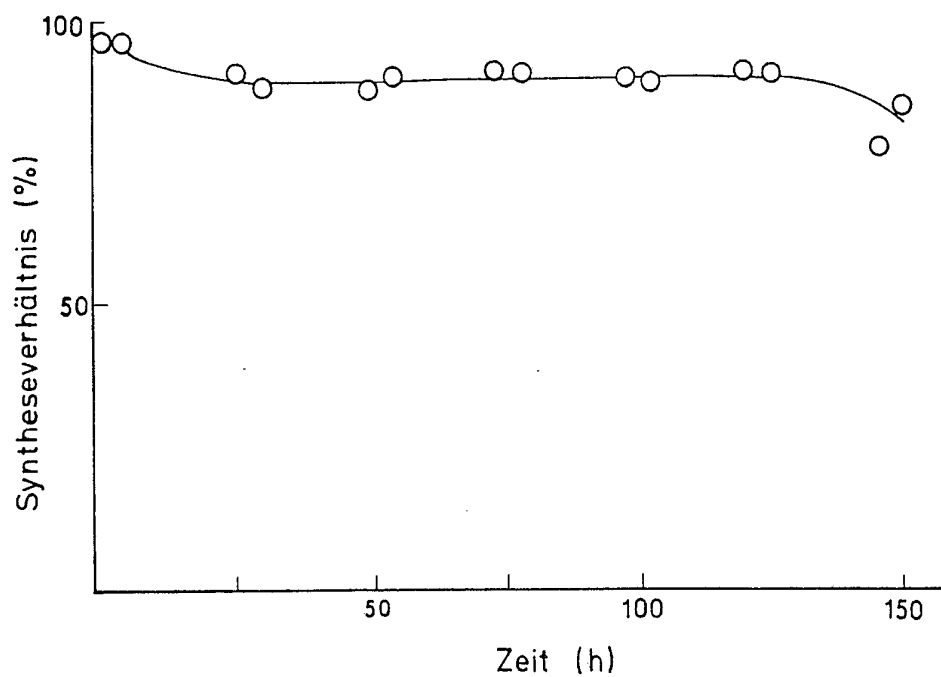


FIG. 3

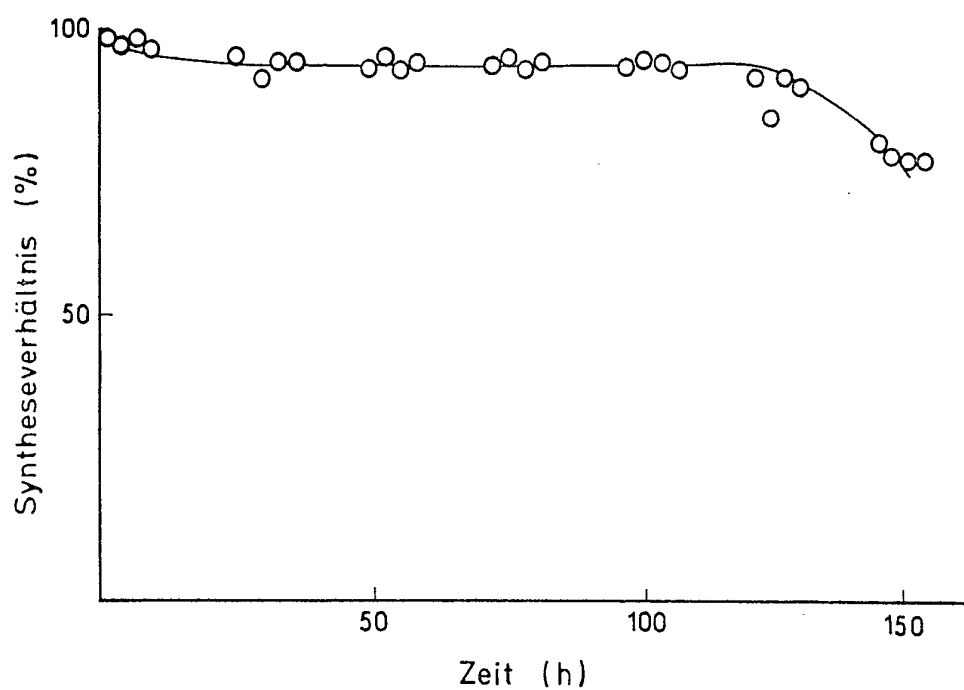


FIG. 4

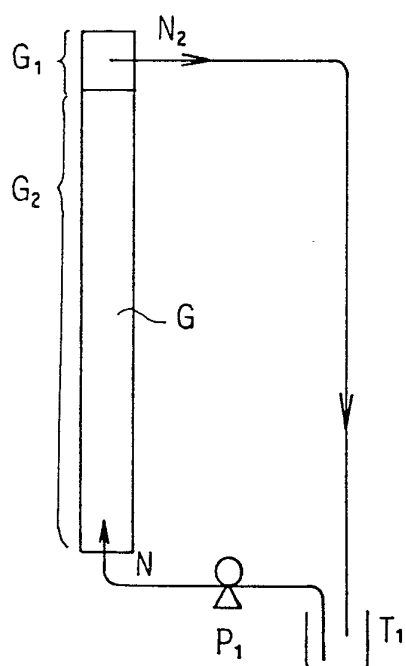


FIG. 5

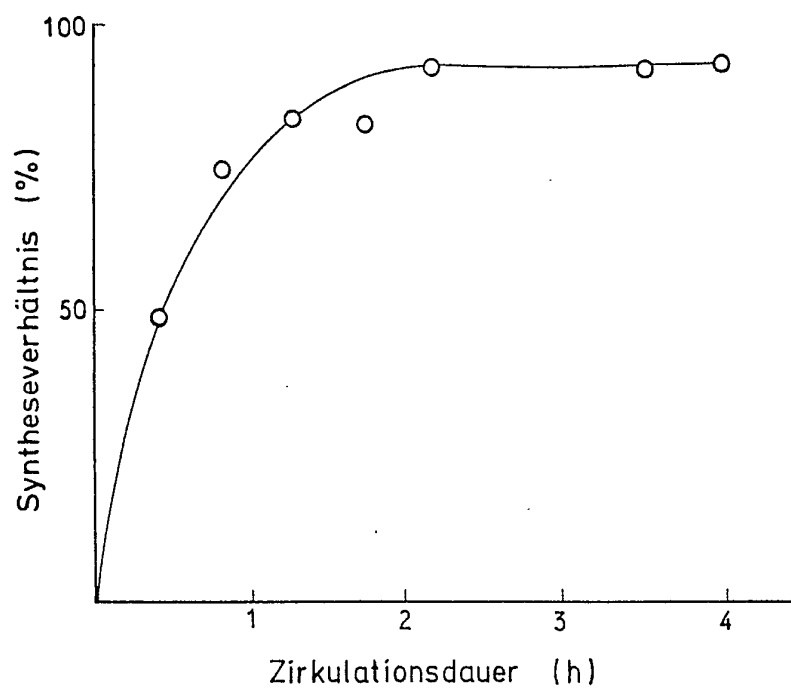


FIG. 6

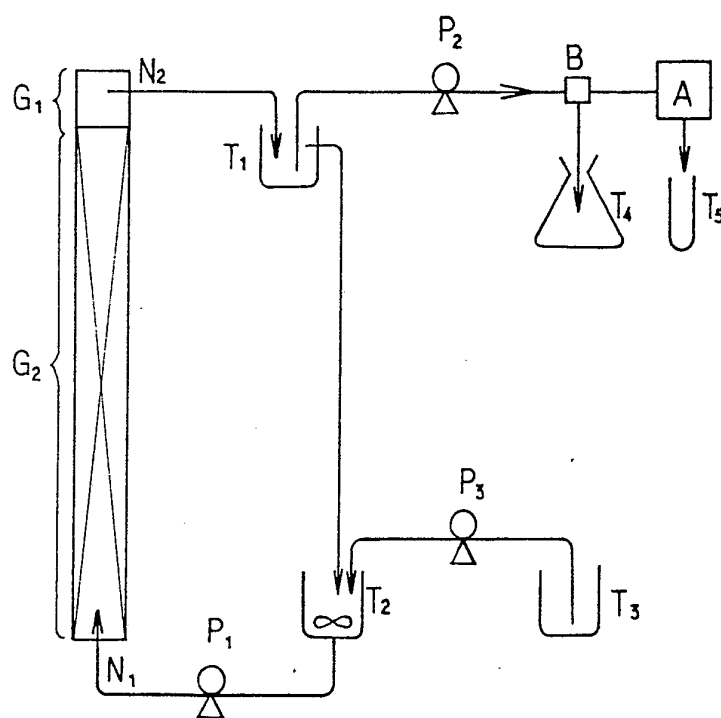


FIG. 7

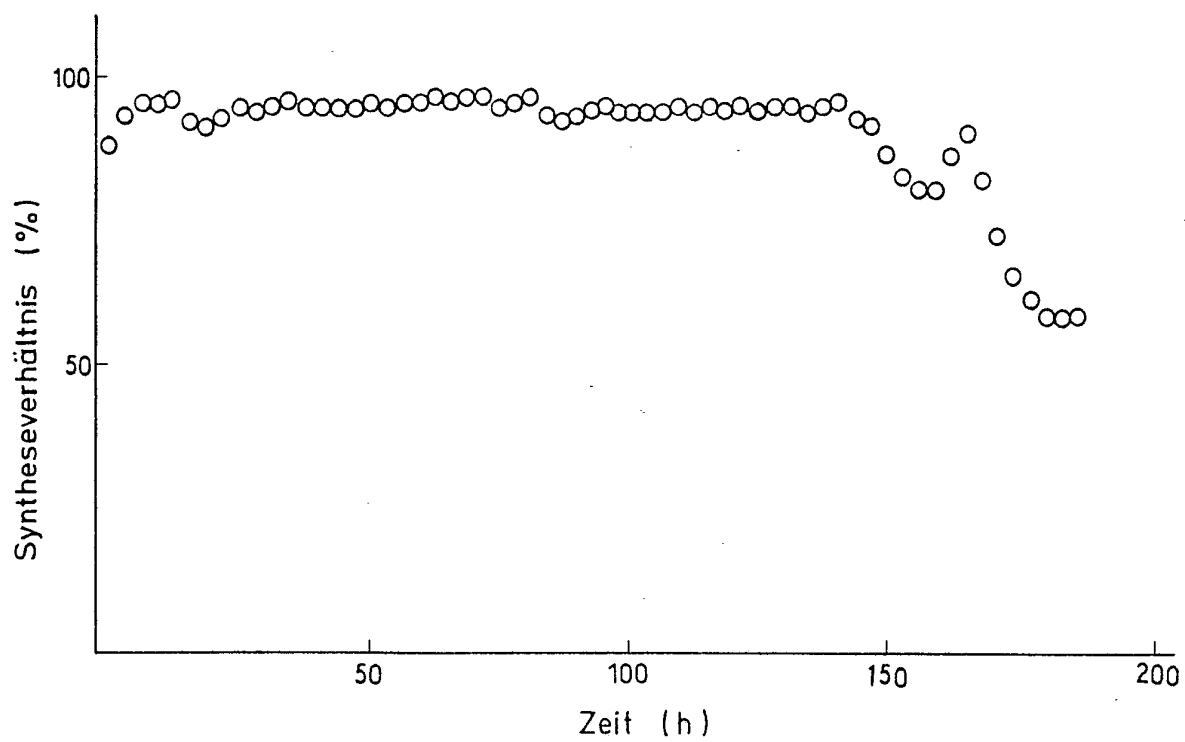


FIG. 8

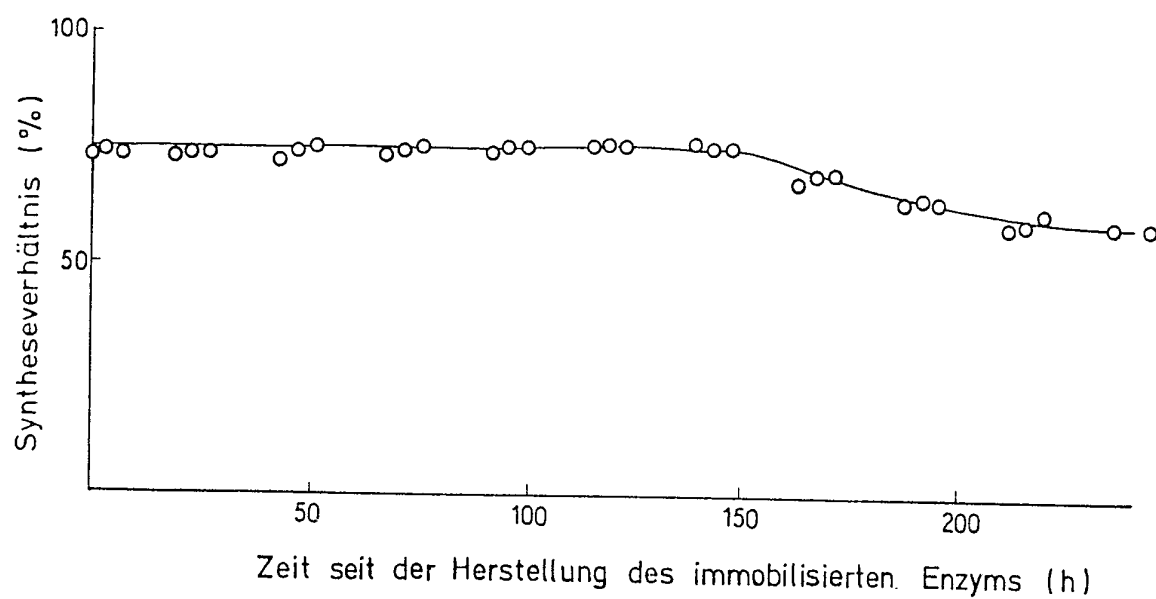
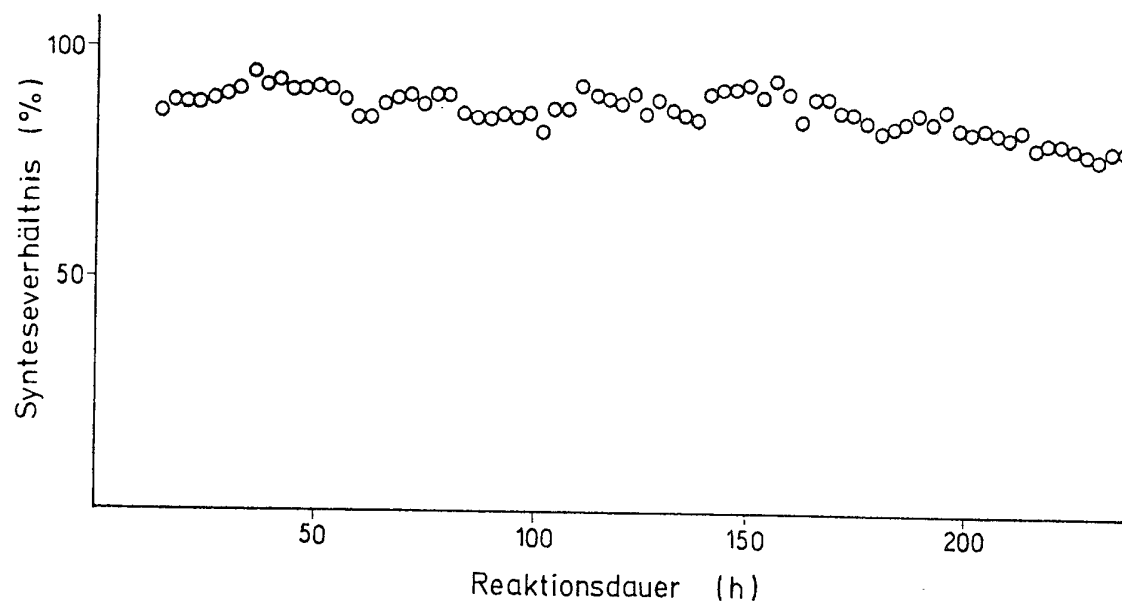


FIG. 9



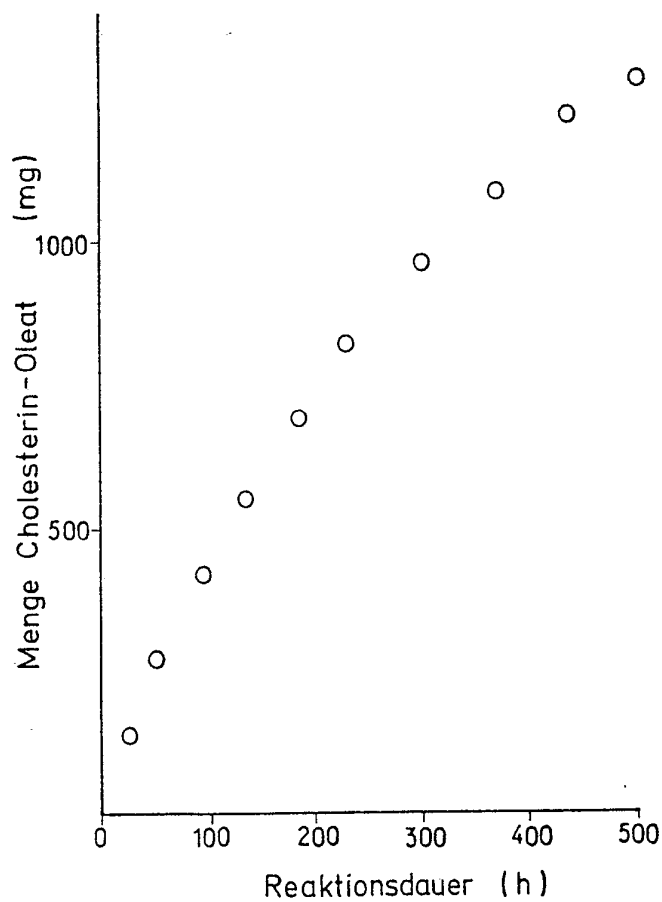


FIG. 10

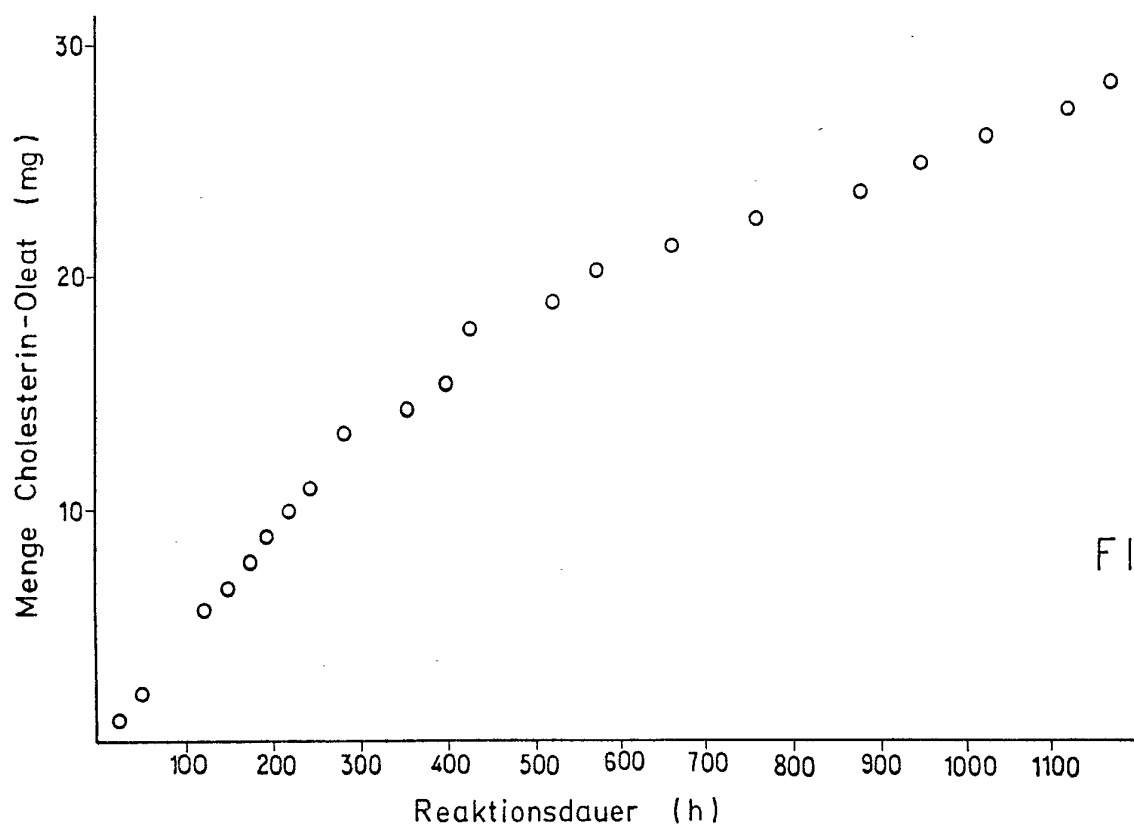


FIG. 11