

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 159883 B



(21) Patentansøgning nr.: 6017/87

(51) Int.Cl.⁵

C 12 P 19/58

(22) Indleveringsdag: 16 nov 1987

C 12 P 19/64

(41) Alm. tilgængelig: 19 maj 1988

C 07 H 15/26

(44) Fremlagt: 24 dec 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 18 nov 1986 DK 5498/86

(71) Ansøger: *Novo Nordisk A/S; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK

(72) Opfinder: Sven Erik *Godtfredsen; DK, Frederik *Bjoerkling; SE

(74) Fuldmægtig: -

(54) **Enzymatisk fremgangsmåde til fremstilling af epoxysubstituerede aldoser eller ketoser**

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

6017-87

Enzymatisk fremgangsmåde til fremstilling af epoxyforbindelser

En epoxygruppe i et molekyle kan ad enzymatisk vej overføres til et andet molekyle, hvorved man kan syntetisere kulhydrater, der bærer en epoxygruppe i aglycon-positionen.

DK 159883 B

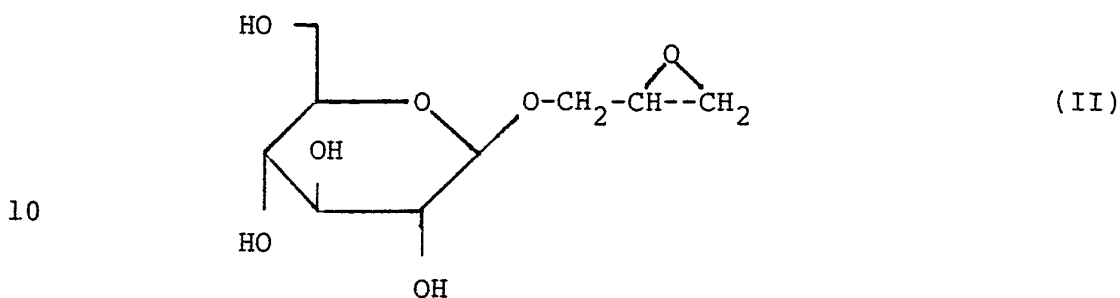
Opfindelsen angår en særlig fremgangsmåde til fremstilling af kendte og hidtil ukendte kulhydrater, der bærer en epoxygruppe som en glucosidisk aglycon eller angivet på en anden måde en særlig fremgangsmåde til fremstilling af 5 epoxysubstituerede aldoser eller ketoser, som har den i krav 1's indledning angivne formel I.

Epoxider er en klasse af organiske forbindelser, der har stor praktisk betydning som mellemprodukter ved organisk syntese og som en klasse af forbindelser, der i sig selv ud- 10 viser mange anvendelige egenskaber. Som følge deraf har man i årenes løb udtænkt mange metoder til syntese af epoxider, beskrevet i anerkendte lærebøger i organisk kemi, såsom f.eks. i Comprehensive Organic Chemistry udgivet af Barton og Ollis og publiceret af Pergamon Press, 1984. Principielt anvendes to 15 hovedmetoder til syntese af et givet ønsket molekyle, som indeholder en epoxygruppe: Enten dannes epoxygruppen på basis af passende fraktionsgrupper, som findes i en precursor for det ønskede molekyle, såsom en gruppe, der indeholder en dobbeltbinding af typen carbon-carbon, eller også indføres 20 epoxidet i det ønskede molekyle ved en kondensationsreaktion, hvor én af reaktanterne bærer en epoxygruppe. Den foreliggende opfindelse er af den sidst angivne art.

En væsentlig vanskelighed, som foreligger ved organisk syntese af epoxider, hidrører fra reaktiviteten af epoxy- 25 gruppen. Under mange forskellige betingelser vil epoxider reagere med opløsningsmidler og et stort antal organiske funktionelle grupper, således at én konsekvens deraf er, at indføring af en epoxygruppe i et komplekst, polyfunktionelt organisk molekyle kan være et yderst vanskeligt, hvis ikke 30 umuligt arbejde.

Et eksempel af denne art har relation til kulhydratmolekyler, som bærer en epoxygruppe i det glucosidiske aglycon, jævnfør formel I. På grund af tilstedeværelsen af mange reaktive grupper i sådanne molekyler, den lave 35 opløselighed af forbindelserne i de fleste organiske opløsningsmidler og den følsomme karakter af molekylerne er

det et vanskeligt og ofte et meget langsommeligt arbejde at fremstille sådanne forbindelser ved organisk syntese. Et eksempel, der er beskrevet af J.E.G. Barnett og A. Ralph i Carbohydr. Res. 17 (1971), 231, angår syntese af 2,3-epoxy-5 propyl- β -D-glucopyranosid, formel II.

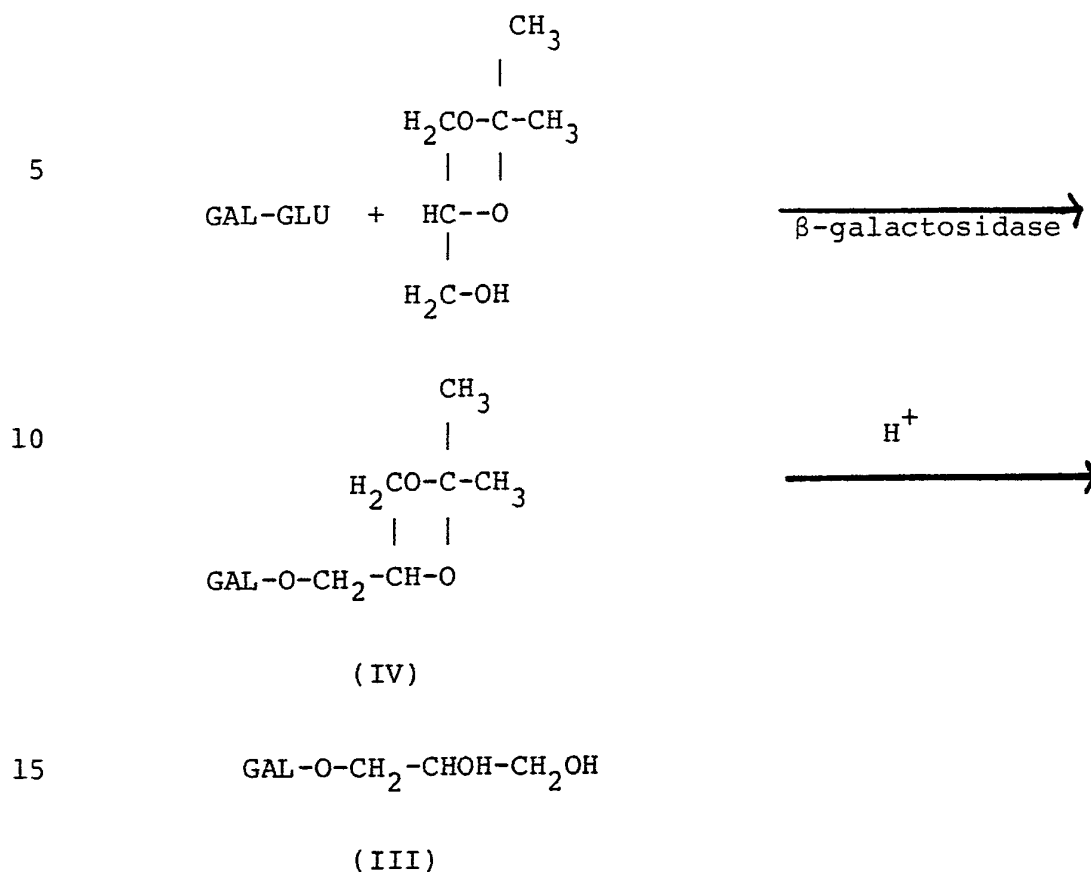


En syntese af kulhydrat-molekyler, hvorpå der findes en epoxygruppe, omfatter en temmelig lang række af syntesetrin, hvorved man går ud fra let tilgængelige udgangsmaterialer.

I de senere år har der været en voksende interesse hvad angår potentialet for enzymer som organiske katalysatorer. Da disse katalysatorer i mange henseender er enestående, har de mange potentielle anvendelsesmuligheder i den organiske syntese. F.eks. muliggør enzymerne gennemførslen af organiske reaktioner under yderst milde betingelser, og de er ofte substratselektive, hvorved man f.eks. muliggør selektiv omdannelse af en enkelt gruppe blandt adskillige i kemisk henseende meget beslægtede grupper i organiske molekyler eller syntesen af optisk rene organiske komponenter udfra racemiske udgangsmaterialer.

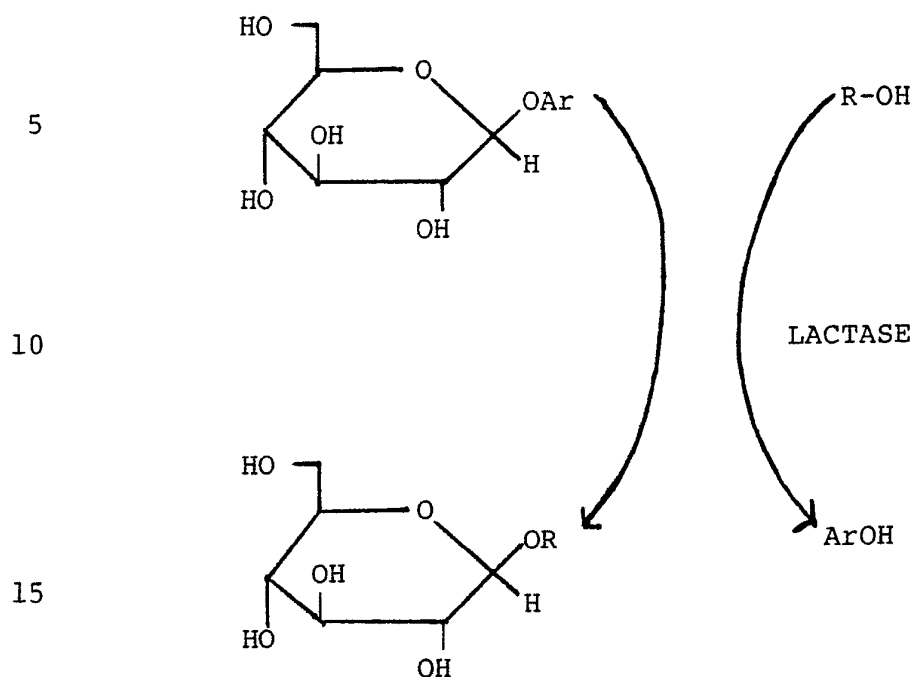
En gruppe af enzymer, der har tiltrukket sig en vis interesse som organiske katalysatorer, er enzymer, der er i stand til at spalte bindinger ved C-1 stillingen (aldoser) eller C-2 stillingen (ketoser) af et kulhydrat. Organiske kemikere har været interesserede i disse enzymer, fordi de muliggør gennemførslen af visse kemiske reaktioner ved de enzymatiske spaltningspositioner.

Anvendelsen af β -galactosidaser til syntese af galactosider illustrerer, hvorledes enzymer, der er i stand til at spalte bindinger ved C-1 stillingen (aldoser) eller C-2 stillingen (ketoser) af kulhydrater, kan anvendes til organisk syntese. I J.Biol. Chem. 248 (1973), 6571 - 6574, beskriver T.J. Silhavy et al., hvorledes (2R)-glyceryl- β -D-galactopyranosid (skema 1, formel III) kan syntetiseres på basis af lactose og isopropylidenglycerol, der kondenseres til det tilsvarende galactosid (skema 1, formel IV) ved at blive udsat
5 for påvirkning af den β -galactosidase, som fremstilles ved hjælp af E. coli og ved derefter at blive spaltet til det ønskede produkt med formel III ved sur katalyse, jævnfør skema
10 1.

Skema 1

GAL-GLU betegner lactose, og GAL betegner galactose.

På lignende måde beskriver T. Satoh et al. i Chem.Pharm.Bull 32 (1984), 1183 - 1187, anvendelsen af lactase fra *Kleuromyces* 20 *fragilis* med henblik på syntese af en serie af galactosider. Som vist i skema 2 nedenfor, gør disse kemikere brug af arylglucosider som udgangsmateriale for en ad enzymatisk vej katalyseret udvekslingsreaktion til syntese af en serie 25 alkylglucosider. Det fremgår af denne publikation, at principielt den samme reaktion kan gennemføres med vidt forskellige radikaler R.

Skema 2

Ar = aryl

20 R = alkyl

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes enzymer til syntese af kulhydrater med formlen I, som på deres C-1 stilling (aldoser) eller C-2 stilling (ketoser) bærer en epoxygruppe. Det har således overraskende vist sig, at

25 molekyler, som bærer en i høj grad reaktiv epoxygruppe, kan anvendes ved enzymatiske reaktioner, og at epoxygruppen kan overføres til et andet organisk molekyle uden at forstyrre eller inaktivere enzymet på trods af, at enzymet indeholder talrige funktionelle grupper, som vides at reagere med

30 epoxider.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 1 angivne.

Hvis således SUGAR er α -glucose-molekyldelen, er det enzym, som skal anvendes, α -glucosidase, hvis SUGAR er β -galactose-molekyldelen, er det enzym, som skal anvendes, β -galactosidase, osv. Disse enzymer udviser ikke blot en
 5 spaltningsaktivitet, men også en tilsvarende overførselsaktivitet i forbindelse med den samme position som spaltningspositionen.

Et defineret SUGAR-radikal i forbindelse med denne opfindelse kan således altid associeres med et enzym med en
 10 defineret aktivitet, hvilket fremgår af den nedenfor angivne tabel, der kun er af illustrerende art.. For nogle SUGAR-radikaler gælder det, at en glycosidase med en relativt uspecifik aktivitet ville være i stand til at katalysere reaktionen, hvorimod mere specifikke glycosidaser er nødvendige
 15 i andre tilfælde.

SUGAR	Glycosidaseaktivitet
ribose	ribosidase
20 xylose	xylosidase
β -galactose	β -galactosidase
glucose	glucosidase
fructose	fructosidase

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden
 25 ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 2 angivne. Både β -galactose og β -galactosidase er let rekvirerbare stoffer, og slutproduktet er et værdifuldt råmateriale til reaktion med organiske syrer.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden
 30 ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 3 angivne. Både lactose og galactosidase er billige og let rekvirerbare.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden
 ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegn-
 35 ende del af krav 4 angivne. Både saccharose og glucosidase er billige og let rekvirerbare.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 5 angivne. På denne måde gør man et meget reaktivt substrat let tilgængeligt.

5 En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 6 angivne. Der foreligger ingen steriske hindringer, og reaktionen kan gennemføres glat og med høje udbytter.

10 En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 7 angivne. På denne måde opnås alle de sædvanlige fordele ved at anvende et immobiliseret enzym.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden
15 ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 8 angivne. Når begge reaktanter er tungt opløselige i vandige medier, foretrækkes denne udførelsesform.

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden
20 ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 9 angivne. Når begge reaktanter er tungt opløselige i rene vandige medier, men letopløselige i en blanding af vand og et organisk opløsningsmiddel, foretrækkes denne udførelsesform.

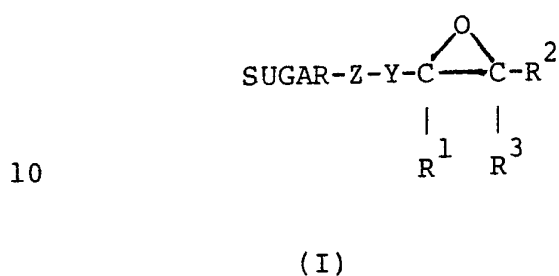
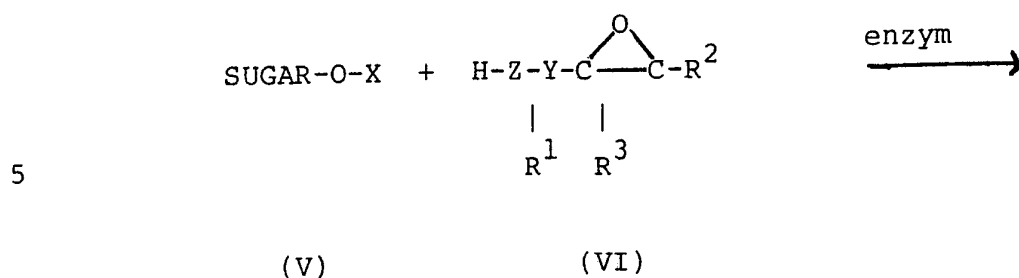
25 En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen omfatter, at den gennemføres i et tofase-system. Når den ene reaktant er let opløselig i et vandigt medium, og den anden reaktant er let opløselig i et organisk opløsningsmiddel, foretrækkes denne udførelsesform, og
30 reaktionen finder sted i mellemfasen.

De reaktioner, som kan udføres ved hjælp af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan sammenfattes som angivet nedenfor i skema 3, hvor X er hydrogen, en kulhydrat-remanens, alkyl eller aryl, hvilke alle kan være substitueret
35 med hydroxy, mercapto, nitro, alkoxy, carboxy eller amino, Z er oxygen eller svovl, Y er alkylen, som kan være

substitueret med hydroxy, mercapto, nitro, alkoxy, carboxy eller amino, og R^1 , R^2 og R^3 er ens eller forskellige og hver for sig repræsenterer hydrogen, alkyl eller aryl, hvorved begge de sidst angivne radikaler kan være substitueret med

- 5 hydroxy, mercapto, nitro, alkoxy, carboxy eller amino, hvorved den (usubstituerede) alkylgruppe fortrinsvis indeholder 6 karbonatomer eller under 6 karbonatomer, og hvorved den (usubstituerede) arylgruppe fortrinsvis indeholder mellem 6 og 10 karbonatomer, inklusive.

- 10 Fortrinsvis indeholder alkylengruppen 8 karbonatomer eller mindre end 8 karbonatomer, fortrinsvis 4 karbonatomer eller under 4 karbonatomer. Eksempler på foretrukne kulhydrat-remanenser (X) er monosaccharid-remanenser, f.eks. en glucoseremanens. Fortrinsvis er aryl phenyl eller
15 naphthyl, der kan være substitueret eller usubstitueret. De substituerede phenyl- eller naphthylradikaler foretrækkes, f.eks. de nitrosubstituerede radikaler, på grund af den højere reaktivitet af forbindelsen V.

Skema 3

hvor R^1 , R^2 , R^3 , SUGAR, X, Y og Z hver er som defineret i det følgende krav 1.

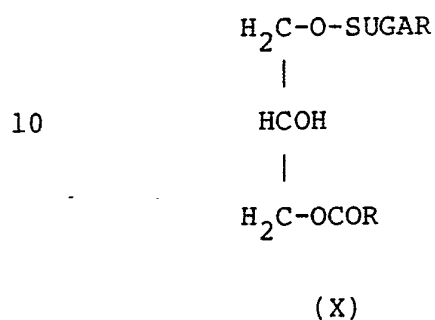
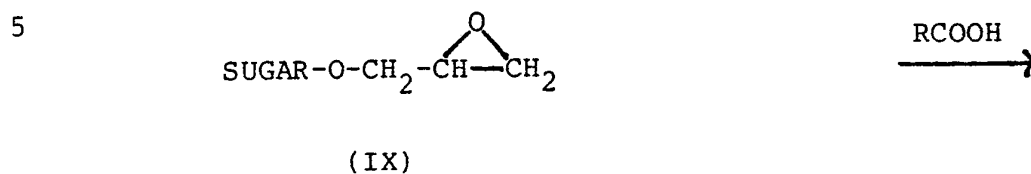
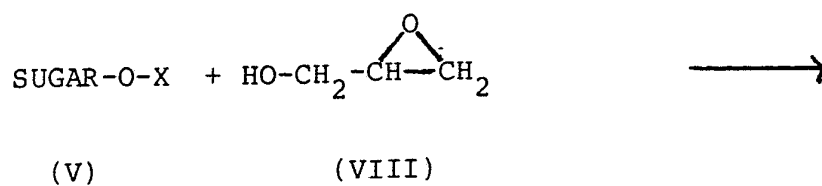
De enzymer, som kan anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er enzymer, der kan spalte -OX-bindingen af forbindelsen SUGAR-O-X (V), vist i skema 3, jfr. krav 1. De enzymer, der anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan foreligge i opløsning eller være immobiliseret. Enzymerne kan også modificeres ved kemiske eller genetiske metoder for at optimere reaktiviteten deraf i forbindelse med den pågældende reaktion.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan gennemføres ved at blande acceptor- og donor-komponenten ved reaktionen, dvs. forbindelserne med formlerne henholdsvis V og VI, i vand, der indeholder enzymet med stuetemperatur. Om ønsket kan reaktionsblandingen opvarmes for at accelerere reaktionen. Man kan også tilsætte organiske opløsningsmidler til reaktionsblandingen for at forøge reaktanternes opløse-

lighed, og reaktionsmediets pH-værdi kan indstilles med henblik på opnåelse af maksimal enzym-aktivitet og/eller - stabilitet.

De forbindelser med den almene formel I, som kan fremstilles ved hjælp af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan anvendes til mange formål. F.eks. muliggør den reaktive epoxygruppe i molekyler med den almene formel I koblingen deraf til andre molekyler. Derfor kan kulhydrat-molekyldele let overføres f.eks. til en matrix, som bærer hydroxyl-
10 grupper, såsom Sepharose eller cellulose, eller kulhydrat-remanenser kan kobles til proteiner, der derved omdannes til glycoproteiner.

En reaktion af speciel interesse, som kan gennemføres under anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er illustreret i skema 4 nedenfor. Ved reaktion med epoxidet med formel VIII kan et substratmolekyle med den almene formel V som vist omdannes til den epoxiderede forbindelse med formel IX, der som vist ved reaktion med en fedtsyre yderligere kan omdannes til monoglyceridet med formlen X. For-
20 bindelserne med den almene formel X, som således kan fremstilles udfra forbindelser med den almene formel IX, der er fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er overfladeaktive midler med stor anvendelighed. Disse forbindelser kan således anvendes i næringsmidler og foder som emulger-
25 ingsmidler, eller de kan anvendes til at forbedre mange funktionelle egenskaber af næringsmidler og foder. De reaktive forbindelser med den almene formel IX kan også kobles til aminosyrer, f.eks. i proteiner, hvorved de funktionelle egenskaber deraf ændres.

Skema 4

hvor R repræsenterer en carboxylsyre-remanens, f.eks. alkyl, og
 15 hvor SUGAR og X hver for sig er som defineret i det følgende krav
 1.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres ved
 de følgende eksempler 1 og 2. Eksempel 3, 4 og 5 illustrerer
 anvendelsen af de epoxyforbindelser, som fremstilles ved
 20 hjælp af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

EKSEMPEL 1Fremstilling af 2,3-epoxypropyl- β -galactopyranosid

β -Galactosidase (leveret af Boehringer Mannheim og udvundet fra *E. coli*, 830 μ l, ca. 50 U, suspenderet i 5 (NH₄)₂SO₄) blev sat til en blanding af 5 g (16,6 mmol) o-nitrophenylgalactopyranosid og 17,5 ml (0,26 mmol) 2,3-epoxy-1-propanol i 400 ml puffer (0,07 M fosfatpuffer, 10 mM MgCl₂, pH = 7). Omsætningen blev fulgt ved tyndtlagskromatografi (i det følgende betegnet TLC) og højtryksvæskekromatografi (i det 10 følgende betegnet HPLC). Efter 4 timers forløb blev blandingen ekstraheret med æter (4 x 100 ml) til fjernelse af nitrophenol, og vandfasen blev inddampet ved reduceret tryk. Produktet blev taget op i ethanol og uorganiske salte blev filtreret fra. Udbyttet ved inddampning var 6,4 g råprodukt.

15 Dette produkt blev underkastet kromatografering på SiO₂ og yderligere krystalliseret af absolut ethanol, hvilket gav 1,1 g (28%) af den i overskriften anførte forbindelse. Smeltepunkt: 126 - 127°C.

¹H NMR(DMSO-d⁶) delta; 2,6 (m, 1H), 2,74 (m, 1H), 3,14 (m, 20 1H), 3,2 - 3,4 (m, 3H), 3,45 - 3,55 (m, 2H), 3,56 - 3,65 (m, 2H), 3,73 (dd, 1H), 4,13 (d, 1H), 4,38 (d, 1H), 4,56 (m, 1H), 4,72 (d, 1H), 4,94 (d, 1H).

¹³C NMR(DMSO-d⁶) delta; 43,8, 50,1, 60,5, 68,2, 69,3, 70,5, 73,4, 75,2, 103,4.

EKSEMPEL 2Fremstilling af 2,3-epoxypropyl- β -D-galactopyranosid

β -Galactosidase (leveret af Boehringer Mannheim og udvundet fra E. coli, 12 mg frysetørret, ca. 2400 U) blev sat
 5 til en blanding af 5 g (13,9 mmol) lactose og 20 ml (0,3 mol) 2,3-epoxy-1-propanol i 300 ml puffer (0,07 M fosfatpuffer, 10 mM MgCl_2 , pH = 7). Reaktionsblandingen blev omrørt i 15 timer ved stuetemperatur og derefter opvarmet til 80°C i 10
 minutter. Vandfasen blev indampet ved reduceret tryk. Pro-
 10 duktet blev taget op i ethanol og filtreret fra uorganiske salte. Inddampning gav det rå produkt som en gul sirup. Yderligere rensning blev udført som i eksempel 1, og dataene var konsistente med de ovenfor angivne.

EKSEMPEL 3
 15 Fremstilling af 1'-O-tetradecanoyl-3'-O- β -D-galactopyranosyl-glycerol

2,3-Epoxypropyl- β -D-galactopyranosid (1 g, 4,2 mmol) blev sat til myristinsyre (1,06 g, 1,1 ækvivalent) ved 80°C. Derefter blev der tilsat tetraethylammoniumbromid (40 mg, 0,05
 20 ml ækvivalent). Den halvfast blanding blev omrørt i 3 timer. Produktet blev taget op i diethylketon/methanol (i det følgende betegnet $\text{Et}_2\text{O-MeOH}$) (50:50) og indampet på SiO_2 efterfulgt af kromatografering, hvorved man fik 1,2 g (61%) af titelforbindelsen, som blev krystalliseret af acetone.

25 ^1H NMR(DMSO-d^6) delta; 0,88 (t, 3H), 1,25 (bs, 20H), 1,54 (m, 2H), 2,32 (t, 2H), 3,25 - 3,6 (mm, 6H), 3,65 (bs, 1H), 3,72 (dd, 1H), 3,83 (m, 1H), 4,0 (m, 1H), 4,08 (m, 2H), 4,4 (d, 1H), 4,6 (t, 1H), 4,75 (d, 1H), 4,9 (d, 1H), 5,0 (d, 1H).

^{13}C NMR(DMSO- d^6) delta; 13,8, 22,0, 24,4, 28,5, 28,6, 28,7, 28,8, 28,9 - 29,0 (4c), 31,2, 33,5, 60,4, 65,4, 67,5, 68,1, 70,4, 70,6, 73,3, 104,0, 172,8.

EKSEMPEL 4

5 Fremstilling af 1'-O-hexadecanoyl-3'-O- β -D-galactopyranosyl-glycerol blev udført på analog måde som i eksempel 3

^1H NMR(DMSO- d^6) delta; 0,86 (t, 3H), 1,25 (bs, 24H), 1,5 (m, 2H), 2,3 (t, 2H), 3,25 - 3,55 (mm, 6H), 3,62 (bs, 1H), 3,7 (m, 1H), 3,8 (m, 1H), 3,96 (m, 1H), 4,05 (m, 2H), 4,4 (d, 1H),
10 4,55 (t, 1H), 4,7 (d, 1H), 4,85 (bs, 1H), 4,98 (d, 1H).

^{13}C NMR(DMSO- d^6) delta; 13,8, 22,0, 24,4, 28,5, 28,7 (2c), 28,9 (2c), 29,0 (5c), 31,2, 33,5, 60,4, 65,4, 67,5, 68,1, 70,4, 70,6, 73,4, 75,3, 104,0, 172,8.

EKSEMPEL 5

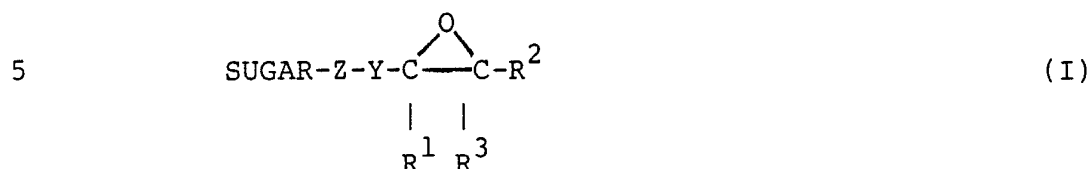
15 Fremstilling af 1'-O-octadecanoyl-3'-O- β -D-galactopyranosyl-glycerol blev udført på analog måde som i eksempel 3

^1H NMR(DMSO- d^6) delta; 0,84 (t, 3H), 1,24 (bs, 28H), 1,5 (m, 2H), 2,28 (t, 2H), 3,25 - 3,55 (mm, 6H), 3,6 (bs, 1H), 3,68 (m, 1H), 3,8 (m, 1H), 3,95 (m, 1H), 4,05 (m, 2H), 4,35 (d, 1H),
20 4,55 (t, 1H), 4,7 (d, 1H), 4,85 (d, 1H), 4,95 (d, 1H).

^{13}C NMR(DMSO- d^6) delta; 13,8, 22,0, 24,4, 28,5, 28,6, 28,7, 28,9, 29,0 (8c), 31,3, 33,5, 60,4, 65,4, 67,5, 68,2, 70,5, 70,7, 73,4, 75,3, 104,0, 172,8.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af epoxysubstituerede aldoser eller ketoser med den almene formel I



hvor SUGAR betyder en galactose-, glucose-, fructose-, xylose- eller ribose-molekyldel, Z betyder oxygen eller svovl knyttet til det terminale, anomere C-1 karbonatom (aldoser) eller C-2 karbonatom (ketoser) af sukker-molekyldelen, Y betyder alkylen, der kan være substitueret med hydroxy, mercapto, nitro, alkoxy, carboxy eller amino og R^1 , R^2 og R^3 , som er ens eller forskellige, hver for sig betyder hydrogen, alkyl eller aryl, hvor alkyl og aryl kan være substitueret med hydroxy, mercapto, nitro, alkoxy, carboxy eller amino, og hvor i tilfælde af, at nogle af radikalerne Y, R^1 , R^2 eller R^3 er substitueret med en OH- eller SH-gruppe, de pågældende radikaler fortrinsvis er beskyttet, kendetegnet ved, at man omsætter en forbindelse med den almene formel V



hvor SUGAR er som ovenfor defineret, og hvor X er hydrogen, en kulhydrat-remanens, alkyl eller aryl, som alle kan være substitueret med hydroxy, mercapto, nitro, alkoxy, carboxy eller amino, med en forbindelse med den almene formel VI



5 hvor R^1 , R^2 , R^3 , Y og Z hver er som ovenfor defineret og hvor
i tilfælde af, at nogle af radikalerne Y, R^1 , R^2 , R^3 eller X
er substitueret med en OH- eller SH-gruppe, de pågældende
radikaler fortrinsvis er beskyttet, og at reaktionen
katalyseres af et enzym, der spalter molekyldelen SUGAR-O- på
10 den position, der er vist ved pilen: SUGAR $\downarrow$ O-.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at SUGAR er
 β -galactose og at enzymet er en β -galactosidase, fortrinsvis
fremstillet ved hjælp af E. coli.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 2, kendetegnet ved, at
15 forbindelsen med formel V er lactose, og at enzymet er
galactosidase.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 3, kendetegnet ved, at
forbindelsen med formel V er saccharose, og at enzymet er
glucosidase.

20 5. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 4, kendetegnet ved, at X er
en arylgruppe med 6-10 karbonatomer.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 2 - 5, kendetegnet ved, at Z er
oxygen, Y er methylen og R^1 , R^2 eller R^3 hver er hydrogen.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 6, kendetegnet ved, at
25 enzymet er immobiliseret.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 7, kendetegnet ved, at
reaktionen gennemføres i et organisk opløsningsmiddel.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 8, **kendetegnet** ved, at reaktionen gennemføres i en blanding af vand og et organisk opløsningsmiddel.