

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

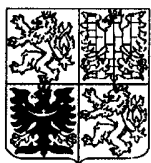
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

4125-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14. 12. 98**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.12.97**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **97/2191**

(33) Země priority: **AT**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 07. 99**
(Věstník č. 7/99)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 C 229/24
C 07 C 227/08

(71) Přihlášovatel:

DSM CHEMIE LINZ GMBH, Linz, AT;

(72) Původce:

Giselbrecht Karl-Heinz, Pasching, AT;
Schaller Josef, Linz, AT;

(74) Zástupce:

Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob výroby kyseliny L-asparagové

(57) Anotace:

Způsob výroby kyseliny L-asparagové pomocí enzymatické katalytické reakce kyseliny fumarové s amoniakem, při kterém se amoniak zůstávající po proběhlé reakci odstraňuje z reakční směsi, kyselina L-asparagová se vysráží přidávkem kyseliny octové nebo kyseliny mravenčí, načež se z matečného louhu přidávkem kyseliny fumarové uvolní kyselina mravenčí a kyselina octová a odštěpený amoniak a rovněž uvolněná kyselina mravenčí nebo kyselina octová a fumaran amonný, vznikající uvolňování, se používají v následujících cyklech.

CZ 4125-98 A3

Způsob výroby kyseliny L-asparagové

Oblast techniky

Kyselina L-asparagová je esencionální výchozí látka pro nejrůznější aditiva pro farmaceutický průmysl a potravinářský sektor. Kyselina L-asparagová se například používá k výrobě umělého sladiva, například aspartamu.

Dosavadní stav techniky

K výrobě kyseliny L-asparagové je proto již popsáno množství chemických a enzymatických postupů. Při enzymatických variantách se kyselina L-asparagová zpravidla získá enzymatickou adicí amoniaku na kyselině fumarové s následujícím vysrážením z takto obdrženého roztoku L-aspartátu amonného.

Vysrážení kyseliny L-asparagové se může provést například přidavkem anorganické kyseliny, jako je kyselina sírová, kyselina chlorovodíková nebo jiné kyseliny, jako například kyselina p-toluensulfonová.

Přitom je však nevýhodné, že je velká ztráta amoniaku a odstraňuje se velké množství odpadních vod s vysokou koncentrací amonných solí použitých kyselin. Z těchto důvodů byla hledána možnost zmenšit nebo zcela zabránit vzniku problematiky odpadní vody.

Podle US 4,560,653 se provádí vysrážení kyseliny L-asparagové například přidavkem kyseliny maleinové. Po oddělení kyseliny L-asparagové se zůstávající matečný louh podrobí izomeraci, při které se kyselina maleinová izomeruje pomocí katalyzátoru obsahujícího iony brómu na kyselinu

fumarovou, následně se čistí a obnovuje se enzymatickou reakcí.

Aby se obešla izomerace, byly hledány další vhodné přísady k vysrážení kyseliny L-asparagové.

V japonském zveřejněném patentovém spise JP 08-33493 (Chem. Abstracts 1223: 315 167) je popisováno použití kyseliny fumarové, případně soli kyseliny fumarové jako srážecího činidla. Nevýhoda této postupové varianty spočívá ve zhoršené rozpustnosti kyseliny fumarové ve vodě, čímž se při zpracování matečného louhu buď musí oddestilovat velké množství vody, nebo je potřebný velmi zředěný postup s velkým reakčním objemem.

Podstata vynálezu

Úkolem vynálezu proto je nalézt způsob, který zabraňuje nynějším problémům při vysrážení kyseliny L-asparagové a vede ke kyselině L-asparagové s vysokými výtěžky a vysokou čistotou.

Neočekávaně byl tento úkol vyřešen použitím kyseliny mravenčí nebo kyseliny octové jako srážecího činidla a za cirkulace všech reakčních pochodů.

Předmětem vynálezu je proto zlepšený způsob výroby kyseliny L-asparagové pomocí enzymatické katalytické reakce kyseliny fumarové s amoniakem, charakterizovaný tím, že

- a) kyselina fumarová v inertním rozpouštědle za přítomnosti aspartázy nebo mikroorganismů produkujících aspartázu reaguje s amoniakem na L-aspartát amonný, následně
- b) se z reakční směsi oddělí amoniak a
- c) ze zůstávající reakční směsi se přísadkou kyseliny mravenčí nebo kyseliny octové vysráží kyselina L-asparagová, potom se oddělí, pere a suší,

- d) z matečného louhu obsahujícího mravenčan, případně acetat amonný a smíchaného s prací vodou se přídavkem kyseliny fumarové uvolňuje kyselina mravenčí, případně kyselina octová,
- e) po filtraci takto získaného roztoku obsahujícího fumaran amonný se filtrát, případně spolu s čerstvou kyselinou mravenčí, případně kyselinou octovou přidává opět do kroku c) k vysrážení kyseliny L-asparagové a
- f) zůstávající fumaran amonný se smíchá s amoniakem z kroku b) a jako adukt se přidává do kroku a).

U způsobu podle vynálezu se kyselina L-asparagová vysráží pomocí kyseliny mravenčí nebo kyseliny octové. Reakční produkty se podle vynálezu všechny vedou v cyklu.

První krok způsobu podle vynálezu zahrnuje enzymatickou reakci kyseliny fumarové s amoniakem. Reakce přitom nastává v inertním rozpouštědle. Jako inertní rozpouštědlo je vhodná voda, směsi voda/ethanol nebo směsi voda/aceton a podobně. Přednostně se používá voda. Kyselina fumarová se přitom může použít v koncentracích až k hranici rozpustnosti, takže se obdrží buď roztok nebo suspenze. V tomto roztoku, případně suspenzi je amoniak plynný, tekutý nebo v podobě 10 až 35 hmot. %ního roztoku, čímž se zvýší teplota až na 60 °C a pH nastaví mezi 7 a 9.

Přednostně se používá vodnatý roztok s 20 až 30 hmotn. % amoniaku. Do takto získaného systému, přednostně roztoku, se potom při teplotě 20 až 60 °C, přednostně při 30 až 50 °C, zamíchá enzym aspartasu nebo mikroorganismus produkující aspartas. Tento přídavek enzymu, respektive mikroorganismu produkujícího aspartas je výhodný, když se přídavkem amoniku obdrží roztok, poněvadž v případě suspenze je potřebné více enzymu vlivem adsorpce enzymu a tím podmíněné ztráty aktivity. Pro téměř kvantitativní reakci po 24 až 30 hodinách je potřeba

enzymová aktivita 30 až 50 IU na mol kyseliny fumarové. Mikroorganismy produkující aspartas jsou například *pseudomonas fluorescens*, *protens vulgaris*, *pseudomonas aeruginosa*, *serratia marcescens*, *bacterium succinum*, *bacillus subtilis*, *aerobacter aerogenes*, *micrococcus sp.*, *escherichia coli* a podobně.

Další vhodné mikroorganismy produkující aspartas jsou například popsány v US 3,791,926 a US 3,198,712.

U způsobu podle vynálezu se dále mohou použít čištěné nebo syntetické aspartasy. Enzym, případně mikroorganismus produkující aspartas se mohou přidat v tekuté nebo imobilizované podobě, jak je například popsáno v EP 0 127 940.

Po úplné reakci, přičemž konec reakce se může například zjistit fotometricky, nastává podle kroku b) oddělením amoniaku destilací nebo stripováním.

Krok b) může nastat při běžném tlaku nebo při redukovaném tlaku a při teplotách 30 až 110 °C, přednostně při teplotách 40 až 90 °C. Přebytkový amoniak se přitom z reakční směsi oddělí pomocí rychlých destilačních metod. Podle destilační metody se přitom pracuje při běžném tlaku nebo při redukovaném tlaku mezi 80 a 200 mbar. Takto získaný amoniakový destilát se opět používá v následujícím postupovém kroku, kroku f), případně jako adukt pro následující další enzymatické reakce.

Po oddělení amoniaku se v kroku c) vysráží kyselina L-asparagová.

K tomu se k roztoku L-aspartatu monoamonnému, získanému odstraněním amoniaku přidá kyselina mravenčí nebo kyselina octová v molárním poměru L-aspartatu monoamonného ke kyselině mravenčí, případně kyselině octové 1:0,8 až 2,

přednostně 1:1 až 1,2. Přednostně se používá jako srážecí činidlo kyselina mravenčí. Hodnota pH leží při srážení mezi 4 a 6.

Od druhého reakčního cyklu se k roztoku L-aspartatu monoamonnému přidává jako srážecí činidlo filtrát fumaranu amonného, který obsahuje uvolněnou kyselinu mravenčí, případně kyselinu octovou, obsažené z následujícího kroku e). K dosažení požadovaného molového poměru mezi aspartatem a srážecím činidlem se filtrát eventuálně doplní kyselinou mravenčí, případně kyselinou octovou.

Reakční teplota leží mezi 0 a 95 °C, přednostně 20 a 90 °C, zvláště přednostně mezi 40 a 70 °C. Krystalizovaná kyselina L-asparagová se potom z reakční směsi odfiltruje, například absorpční filtrací nebo odstředěním. Přednostně se kyselina L-asparagová oddělí odstředěním. Filtrační teplota leží mezi 10 a 70 °C, přednostně mezi 15 a 50 °C. Odfiltrované krystaly kyseliny L-asparagové se následně perou, přednostně vodou, a suší se. Na základě velmi dobré rozpustnosti mravenčanu, případně acetátu amonného je pro praní čerstvě krystalizované kyseliny L-asparagové potřebné jen velmi málo prací vody. Kyselina L-asparagová se tím může prát také při nízkých teplotách. Jestliže obsahuje kyselina L-asparagová vlivem použití kyseliny fumarové jako srážecího činidla mravenčan amonný, jsou naproti tomu potřebné vyšší teploty praní a vyšší množství prací vody.

Smíchají se zůstávající filtrát, obsažený po oddělení kyseliny L-asparagové a prací voda zůstávající po praní, případně se až z poloviny se odpaří, promíchají se s kyselinou fumarovou a ohřejí se k opětovnému uvolnění kyseliny mravenčí, případně kyseliny octové v závislosti na zvolené destilační metodě za redukovaného tlaku nebo běžného tlaku až na teplotu varu.

Přednostně se kyselina fumarová přidává při teplotě maximálně 100 °C, zvláště přednostně při teplotě maximálně 70 °C. Destilační voda se přitom oddestiluje s malým podílem, 1 až 5 mol. % kyseliny mravenčí, případně kyseliny octové.

Zůstávající roztok se filtruje, případně odstřeďuje a filtrát fumaranu amonného, obsahující velký podíl kyseliny mravenčí, případně kyseliny octové se opět použije od druhého cyklu v kroku c) k vysrážení kyseliny L-asparagové.

Vedle toho se případně doplní množství oddestilované při uvolnění kyseliny přídatkem čerstvé kyseliny mravenčí, případně kyseliny octové.

Zůstávající pevný fumaran amonný se naprotitomu smíchá s amoniakem oddestilovaným v kroku b) a přidává se od druhého cyklu k enzymkatalytické reakci jako adukt v kroku a). Současně se doplní chybějící množství amoniaku přídatkem amoniaku, přednostně ve formě 10 až 35 hmotn. %ního roztoku, takže se opět hodnota pH nastaví mezi 7 a 9.

Eventuálně přítomný mravenčan amonný enzymatickou reakci neruší. Způsobem podle vynálezu se obdrží kyselina L-asparagová s výtěžkem přes 80 %, až k 95 % a obsahem přes 99,5 %.

Přehled obrázků na výkresech

Způsob podle vynálezu, jednotlivé jeho kroky, je patrný z obr., na kterém je schématicky znázorněno vedení reakčních produktů.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1:

900 ml (955 g) reakčního roztoku kyseliny L-asparagové (DSM-Chemie Linz), obsahujícího 240,6 g (1,80 mol) kyseliny L-asparagové, vyrobeného reakcí 210 g (1,8 mol) kyseliny fumarové a 406 ml 25 hmotn. %ního roztoku amoniaku (366 g) ve 420 ml H₂O za přítomnosti 0,15 ml roztoku aspartasy (1000 IU/ml), bylo oddestilováno při 75 °C a tlaku 150 mbar pomocí 526 g NH₄OH. Kal byl zředěn na 955 g destilovanou vodou. Odsál se zbytek enzymů a při 85 °C bylo přidáno 82,8 g (1,8 mol) kyseliny mravenčí. Získalo se 251,9 g pevné látky (F1) a 744 g matečného louhu 1 (Mula 1). Matečný louh (Mula 1) se ochladil na teplotu okolí a oddělila se přitom vysrážená pevná látka.

Přitom se obdrželo 51,7 g pevné látky (F1.1) a 678,5 g matečného louhu (Mula 1.1).

Obě množství pevné látky se zředila 250 ml H₂O, ohřála se na reflux a ochladila na teplotu okolí a vysrážená pevná látka se oddělila od matečného louhu.

Mula 2: 191 g

F2: 288,0 g (s 30,1 % H₂O)

F2 se opět zředilo 250 ml H₂O, znovu se ohřálo na teplotu refluxu a následně se ochladilo na teplotu okolí.

Mula 3: 244 g

F3: 286,3 (s 33,4 % H₂O)

F3 bylo sušeno při 70 °C a ve vakuu, čímž se obdrželo 195,2 g kyseliny L-asparagové (s 0,1 % H₂O).

Ke zpracování matečného louhu byly všechny šarže (Mula

1, 1.1, 2 a 3) spojeny a při 70 °C a 150 mbar bylo oddestilováno 525 ml H₂O. Ke kalu (565 g) se přidalo 210 g (1,8 mol) kyseliny fumarové a ohřál se na teplotu varu (102 °C), čímž se rozpustila veškerá pevná látka.

Následně se provedla vakuová destilace při 100 mbar a poměru refluxu 5:1.

Destilát 1: 100 g teplota kalu 48,5 °C
teplota na hlavě 46,8 °C

Destilát 2: 102 g teplota kalu 48,5 °C
teplota na hlavě 48,8 °C

Při totálním poklesu bylo destilováno dále. Celkem se obdrželo 1823 g destilátu. Zůstávající kal byl ochlazen na teplotu okolí a byla odsáta vysrážená pevná látka.

Mula 4: 543,8 g

F4: 360 g (18 % H₂O)

F4 (odpovídá 2,1 mol kyseliny fumarové) bylo potom rozpuštěno v 441 g destilované vody, smícháno s 353,5 g (2,1 mol) 25 %ního amoniaku (pH 9,3) a bylo ponecháno reagovat za přítomnosti 0,15 g aspartasu 24 hodin při 50 °C ve skříňové sušárně.

Přitom bylo docíleno obratu 99,1 %.

Příklad 2:

Reakční cyklus 1:

První cyklus byl proveden analogicky s příkladem 1. Bylo opět získáno 195 g kyseliny L-asparagové (0,1 % H₂O).

Obsah kyseliny mravenčí činil 0,1 %, obsah kyseliny fumarové činil 0,3 %, ke zpracování matečných louhů byly opět všechny šarže spojeny a destilovány při teplotě 70 °C a tlaku 150 mbar 525 g.

K 565 g kalu bylo opět přidáno 210 g (1,8 mol) kyseliny fumarové, směs se ohřála na teplotu varu (102 °C), ochladila se na 10 °C a oddělila se vysrážená usazenina.

Získalo se 369 g Mula 4. Pevná látka (F4) byla vyprána 100 ml destilované vody na nuč.

F4: 367,8 g (32,6 % H₂O)
prací voda (W4): 115 g

Reakční cyklus 2:

K 367 g F4 bylo přidáno 450 g destilované vody a 238,2 g (3,4 mol) 25 %ní čpavkové vody a za přítomnosti 0,13 g aspartasu při pH 8,7 a 50 °C bylo ponecháno 72 hodin reagovat ve skříňové sušárně.

Následně byl takto získaný reakční roztok (1050 g, 945 ml) koncentrován při 70 °C a tlaku 150 mbar na polovinu.

587,5 g destilátu
450 g kalu (enzymatický zbytek byl odfiltrován, pH 5,4).

Kal se ohřál na 80 °C a co možná rychle byl přidán ke směsi z Mula 4 a W4 z reakčního cyklu 1 a 14 g (17 %) čerstvé kyseliny mravenčí. Přitom se směs ochladila na 10 °C. Následně byla odstředěna vysrážená pevná látka (F5) a provedeno praní 200 ml vody (W5).

Mula 5: 606 g

W5: 203 g
F5: 262,4 g (40,4 % H₂O)

F5 bylo sušeno při 75 °C a ve vakuu. Bylo získáno 154,2 g kyseliny L-asparagové (obsah 0,1 % kyseliny mravenčí, 0,3 % kyseliny fumarové).

Mula 5 a W5 (791 g) byly spojeny a při teplotě 70 °C a tlaku 150 mbar byly koncentrovány.

Zůstávající kal (500 g) se ohřál na 80 °C a pomalu bylo přidáváno 210 g (1,8 mol) kyseliny fumarové, byl proveden ohřev na reflux (105 °C), zředění 300 ml destilované vody, takže vznikl roztok a následně se ochladil na teplotu okolí. Vysrážená pevná látka (F6) byla odstředěna a vyprána.

Mula 6: 634 g
W6: 104 g
F6: 296 g, (12,3 % H₂O)

Reakční cyklus 3:

K F6 z reakčního cyklu 2 bylo přidáno 587 g čpavkového destilátu z reakčního cyklu 2 a 177 g (2,52 mol) čerstvého čpavku a bylo ponecháno reagovat za přítomnosti 0,2 ml enzymu při 50 °C 24 hodin ve skříňové sušárně. Obrat činil 98,4 %. Takto získaný reakční roztok (1015 g) byl koncentrován při teplotě 70 °C a tlaku 150 mbar na polovinu. Destilát činil 481 g.

Zůstávající kal se po odfiltrování zbytku enzymů ohřál na teplotu 65 °C a pomalu se k němu přidávalo 738 g směsi z Muly 6 a W6

Směs byla následně 2 hodiny při teplotě 65 °C míchána,

ochlazená na teplotu 10 °C, byla odstředěna pevná látka (F7) a bylo provedení praní 200 ml vody (W7).

Mula 7: 1019 g
W7: 200 g
F7: 168 g (7,7 % H₂O)

F 7 bylo sušeno při teplotě 75 °C ve vakuu. Bylo získáno 154,2 g kyseliny L-asparagové.

Mula 7 a W7 byly spojeny a koncentrovány při teplotě 70 °C a tlaku 150 mbar. 504,6 g kalu bylo potom ohřáto na 70 °C, bylo k němu přidáno 210 g (1,8 mol) kyseliny fumarové a 100 ml vody a 2 hodiny mícháno, ochlazená na teplotu okolí a vysrážená pevná látka (F8) odstředěna a prána (W8).

Mula 8: 337 g
W8: 196,4 g
F8: 404 g (18,5 % H₂O)

Reakční cyklus 4:

K 404 g F8 bylo přidáno 481 g čpavkového destilátu z cyklu 3 a 177 g čerstvého amoniaku a bylo ponecháno 24 hodin reagovat s 0,2 ml enzymu při pH 8,7 a teplotě 50 °C. Obrát činil 98,7 %.

Postup zpracování nastává analogicky s cykly 1 až 3. Bylo získáno 315 g kyseliny L-asparagové.

Následně byl analogicky s reakčními cykly 1 až 4 proveden cyklus 5. Bilance pěti cyklů je patrná z tabulky 1.

Tabulka 1

	FS	NH ₄ FS	NH ₃	AS	L-asp.	L-asp. výtěžek sraženina	pH u L-asp.
	mol	mol	mol	mol	mol	%	
1. cyklus	1,80	1,80	4,32	1,80	1,46	81,50	5,5
2. cyklus	1,80	1,85	3,40	0,30	1,15	64,40	5,3
3. cyklus	1,80	1,95	2,50	0,00	1,10	62,60	5,0
4. cyklus	1,80	2,47	3,00	1,80	2,36	131,80	4,4
5. cyklus	1,80	1,84	3,00	0,00	1,81	100,80	4,4
součet	9,00	9,91	16,22	3,90	7,89	88,58	

V tabulce 1 značí FS kyselina fumarová, NH₄FS mravenčan amonný, AS kyselina mravenčí, L-asp. kyselina asparagová.

JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát



SPOLLEČNÁ ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ
VSETEČKA ZELENÝ ŠVORČÍK KALENSKÝ
A PARTNEŘI
120 00 Praha 2, Hájkova 2
Česká republika

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby kyseliny L-asparagové pomocí enzymatické katalytické reakce kyseliny fumarové s amoniakem, **vyznačující se tím, že**
 - a) kyselina fumarová v inertním rozpouštědle za přítomnosti aspartasy nebo mikroorganismů produkujících aspartasu reaguje s amoniakem na L-aspartát amonný, následně
 - b) se z reakční směsi oddělí amoniak a
 - c) ze zůstávající reakční směsi se přidavkem kyseliny mravenčí nebo kyseliny octové vysráží kyselina L-asparagová, potom se oddělí, pere a suší,
 - d) z matečného louhu obsahujícího mravenčan, případně acetát amonný a smíchaného s prací vodou se přidavkem kyseliny fumarové uvolňuje kyselina mravenčí, případně kyselina octová,
 - e) po filtraci takto získaného roztoku obsahujícího fumaran amonný se filtrát, případně spolu s čerstvou kyselinou mravenčí, případně kyselinou octovou přidává opět do kroku c) k vysrážení kyseliny L-asparagové a
 - f) zůstávající fumaran amonný se smíchá s amoniakem z kroku b) a jako adukt se přidává do kroku a).
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím, že se jako rozpouštědlo v kroku používá voda, směs voda/ethanol nebo směs voda/aceton.**
3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím, že se krok a) provádí při hodnotě pH mezi 7 a 9.**
4. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím, že se amoniak při kroku b) oddestiluje při teplotě mezi 30 a 110 °C a venkovním tlaku nebo při redukovaném tlaku.**

5. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se oddestilování amoniaku v kroku b) provádí stripováním nebo tenkovrstvým odpařováním.
6. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se krok c) provádí při hodnotě pH mezi 4 a 6.
7. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se krok c) provádí při teplotě mezi 0 a 95 °C.
8. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se přídavek kyseliny fumarové v kroku d) provádí při teplotě maximálně 100 °C, přednostně při teplotě maximálně 70 °C.
9. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se směs získaná v kroku f) z fumaranu amonného a amoniaku z kroku b) doplní amoniakem až k dosažení hodnoty pH mezi 7 a 9 a použije se jako adukt v kroku a).

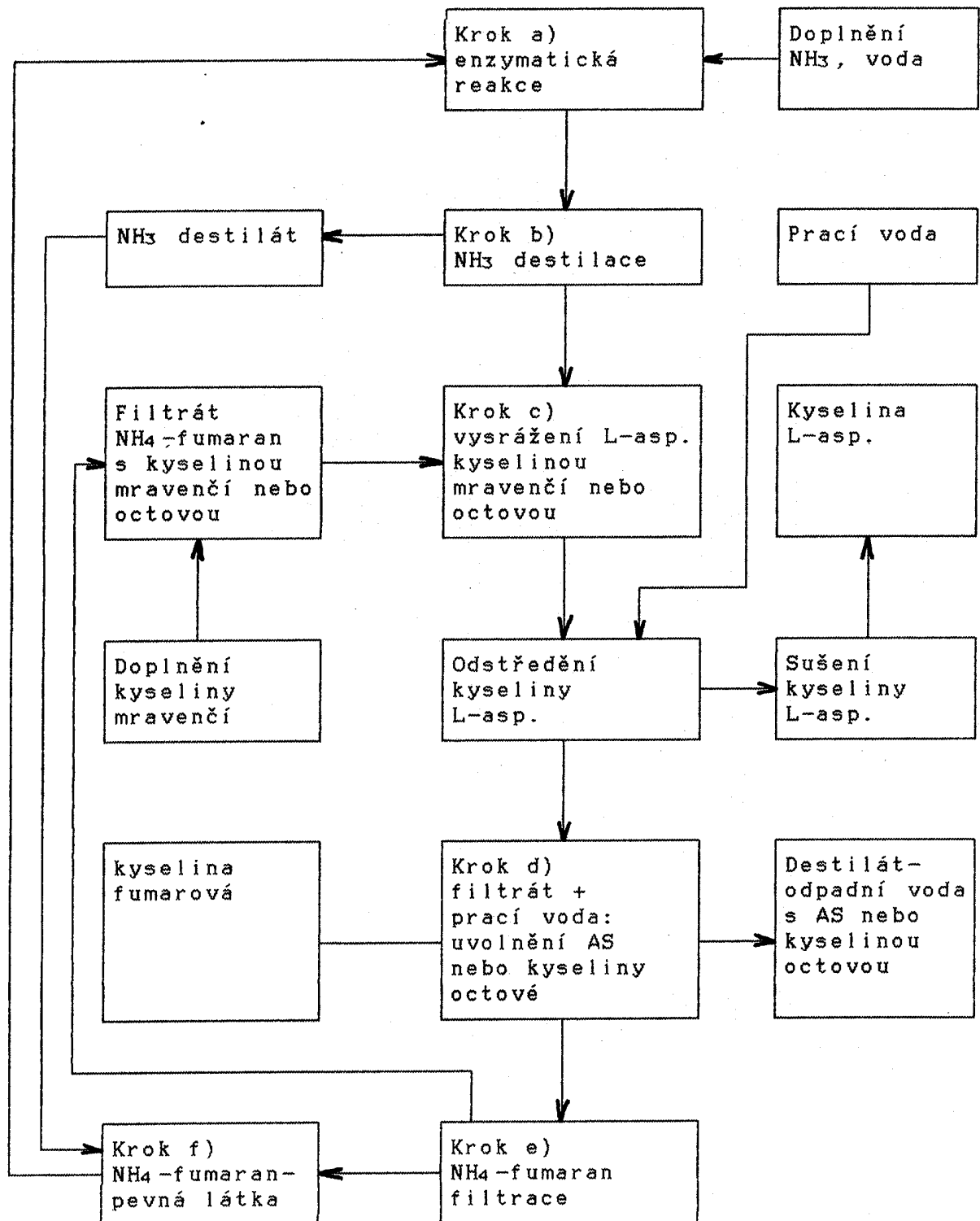
JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát


SPOLÉČNÁ ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ
VŠETECKA ZELENÝ ŠVORČÍK KALENSKÝ
A PARTNEŘI
120 00 Praha 2, Hájkova 2
Česká republika

14.10.98

71 4125-SP

OBR.



JUD. M. KALENSKY
advokát

[Handwritten signature]

V. 9. 88