

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 148358 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 4729/75
(22) Indleveringsdag: 21 okt 1975
(41) Alm. tilgængelig: 23 apr 1976
(44) Fremlagt: 17 jun 1985
(86) International ansøgning nr.: -
(30) Prioritet: 22 okt 1974 FR 7435496

(51) Int.Cl.4: C 07 H 7/02

(71) Ansøger: *UNION COOPERATIVE AGRICOLE LAITIERE DE LA MANCHE; Brix, FR.
(72) Opfinder: Jean-Marie *Eustache; FR.

(74) Fuldmægtig: Patentbureauet Hofman-Bang & Boutard

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af N-acetylneuramin-
syre ud fra mælkeserum fra oste- og/eller ca-
seinfremstilling

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af N-acetylneuraminsyre ud fra mælkeserum fra oste- og/eller caseinfremstilling under anvendelse af ultrafiltrering.

5 Mælkeserum fra ostefremstilling er en gullig væske, der efter at være befriet for fedtstoffer ved centrifugering væsentligst består af lactose, proteiner og mineralsalte.

Man har foreslået behandlinger af mælkeserum fra ostefremstilling for at fjerne dettes forurenende karakter og for at genvinde de proteiner, der befinder sig deri. Mælkeserum fremstilles i stor mængde ved mejerier og osterier, idet mælkeserum ved ostefremstilling dannes fra mælken efter en enzymatisk virkning, og især efter en traditionel løbning. Man har foreslået at separere proteinerne fra mælkeserum ved ultrafiltrering.

Imidlertid har man ikke tidligere anvendt ultrafiltrering med henblik på separering og udvinding af visse særlige proteiner eller andre forbindelser, der i sig selv har stor interesse.

20 Dette er specielt tilfældet med sialinsyrer, der også benævnes N-acylneuraminsyrer (jf. Merck Index 7. edition, p. 715). Man ved, at sialinsyrer findes i dyriske komplekser af carbonhydrater og proteiner. Af denne årsag fremstilles forbindelserne for tiden enten ud fra naturlige råmaterialer, såsom købespytkirtler fra okser, eller æg, eller de fremstilles ved syntese.

Som reference på dette område kan nævnes artiklen af M.W. Whitehouse og F. Zilliken "Isolation and Determination of Neuraminic (sialic) acids", p. 199-220 i "Methods of Biochemical analysis", volumen VII (1960) Interscience, John Wiley Sons.

Disse kendte fremgangsmåder til fremstilling af sialinsyrer er ekstremt kostbare, hvilket afspejles i prisen på produktet i handelen.

- 5 Anvendelsen af sialinsyrer og specielt N-acetylneuraminsyre (forkortet NANA) er beskrevet i følgende artikler:

"Coagulation du lait par la présure: Aspects scientifiques et techniques";

Garnier, Mocquot, Ribadeau - Dumas, Maubois - Ann. de Nutrition Alimentaire, 1968, 22, B 495 - B 552;

- 10 Svennerholm, L. Acta Soc. Med. upsaliensis, 61, 75 (1956)
Arkiv. Kemi., 10, 577 (1956);

Warren, L., J. Biol. Chem. 233, 1971 (1959);

Werner, I. og L. Odin, Acta Soc. Med. Upsaliensis 57, 230 (1952);

- 15 Aminoff, D. (1961) Biochem J. 81, 384;

"The Sentivity of the Neuraminosidic Linkage in Mucosubstances toward Acid and towards Neureaminidase Gibbons";
Biochemistry Journal (1963) 89, 380;

- 20 "Structure studies on the Myxovirus Hemagglutination Inhibitor of Human Erythrocytes".

Ralph H. Kathan og Richard J. Winzler,
Journal of Biological Chemistry (1963), Vol. 238, No.1.p.21.

- 25 "Studies on the Neuraminidase of Influenza virus II additional properties of the enzymes from the Asian and PR 8 Strains", Max E. Rafelson, J.R. Michael Schneir og Wannie W. Wilson, J.R., Archives of Biochemistry and Biophysics 103 (1963) 424-430.

Andre mulige anvendelser for sialinsyrer er angivet i litteraturen om disse forbindelser.

Den foreliggende opfindelse angår som nævnt en fremgangsmåde til behandling af mælkeserum fra ostefremstilling og/eller caseinfremstilling, hvorved man på meget økonomisk vis kan opnå en sialinsyre, nærmere bestemt N-acetylneuraminsyre (forkortet NANA).

Opfindelsen angår således en fremgangsmåde til fremstilling af N-acetylneuraminsyre ud fra mælkeserum fra oste- og/eller caseinfremstilling under anvendelse af ultrafiltrering, og fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at man

- (a) foretager en termisk flokkulering af mælkeproteinerne, bortset fra sialoglycoproteinerne, ved temperaturer under 100 °C til opnåelse af et første bundfald af flokkulerede proteiner og en første overvæske, der frasepareres og opsamles,
- (b) gennemfører en ultrafiltrering af den første overvæske gennem membraner med en adskillelsesevne på ca. 1000 - 15000, udtrykt som molekylvægt, til opnåelse af et koncentrat indeholdende glycoproteiner og N-acetylneuraminsyre,
- (c) foretager en sur hydrolyse af det opnåede koncentrat med svovlsyre ved en koncentration på under 0,5N og ved en høj temperatur, der dog ikke overskrider 98 °C, hvorpå man eventuelt afkøler det hydrolyserede koncentrat til ca. 4 °C til dannelse af et andet bundfald og en anden overvæske, der frasepareres og opsamles, og
- (d) underkaster det hydrolyserede koncentrat eller den anden overvæske en neutralisation til udfældning af frie sulfationer i form af salte ved tilsætning af et

overskud af $Ba(OH)_2$, eventuelt efterfulgt af en ultrafiltrering, hvorefter man enten lader overvæsken eller ultrafiltratet passere gennem en kationbytterharpiks og derpå gennem en anionbytterharpiks og eluerer den fikserede N-acetylneuraminsyre, der om ønsket lyofiliseres, eller tørrer den neutraliserede og klarede overvæske, eventuelt efter passage gennem en kationbytterharpiks, og bringer det således opnåede pulver i intim kontakt med et opløsningsmiddel eller en opløsningsmiddelblanding, hvori N-acetylneuraminsyren er opløselig, eksempelvis ethanol eller en blanding af acetone og vand.

Ved en udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen opnår man ud fra det hydrolyserede koncentrat, opnået i trin (c), ved afkøling til 4 °C et andet bundfald og en anden overvæske, der separeres fra og opsamles. Behandlingen (d) af den anden overvæske til ekstraktion af den indeholdte N-acetylneuraminsyre består af i sig selv kendte operationer, der væsentligst omfatter neutralisation, passage af overvæsken gennem en kationbytterharpiks, fiksering af N-acetylneuraminsyren ved passage gennem en anionbytterharpiks, eluering af den således fikserede syre og udvinding af en særdeles ren opløsning af N-acetylneuraminsyre, der om ønsket lyofiliseres.

Som udgangsmateriale anvender man ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen mælkeserum fra en mælk produceret fra en hvilken som helst drøvtygger (ko, ged, får, bøffelko eller lignende), f.eks. en ko- eller fåremælk, der har undergået en enzymatisk påvirkning, f.eks. ved ostefremstilling en løbning, der fører til dannelsen af et mælkeserum. Et flydende mælkeserum kan også opnås ved tilsætning af vand til et pulverformigt mælkeserum.

Det første trin [trin (a)] ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen består i en selektiv denaturering ved termisk flokkulering af de opløselige proteiner ved en temperatur og i et tidsrum, der er tilstrækkeligt til opnåelse af en sådan flokkulering. Man fælder albuminerne og globulinerne og bevarer i overvæsken pepton-proteaserne, der er glycoproteiner. Det er hensigtsmæssigt at opvarme til relativt høje temperaturer, der dog skal være lavere end 100 °C for at undgå denaturering af glycoproteinerne. Hvis man anvender mere moderate temperaturer, skal varigheden af opvarmningen forøges. Betingelser, der har vist sig passende i praksis, og som i øvrigt er sædvanlige ved denne type fremgangsmåde, består i en opvarmning til 95 °C i 30 minutter. De flokkulerede proteiner, opnået efter trin (a), frasepareres på sædvanlig måde, f.eks. ved centrifugering. Overvæsken opsamles og underkastes de følgende trin i fremgangsmåden.

I trin (b) underkastes overvæsken en ultrafiltrering ved passage gennem en membran, hvis adskillelsesevne er ca. 1000 - 15000 udtrykt som molekylvægt. Egnede membraner til dette formål er kendte uorganiske, organiske eller endog keramiske eller metalliske membraner i den udstrækning, hvor de tilfredsstillende den oven for angivne definition på adskillelsesevnen.

Man kan eksempelvis anvende membraner, der forhandles af Rhone-Poulenc under betegnelsen "Iris[®]", for eksempel en membran Iris 3042, hvis adskillelsesevne er ca. 15000, i ultrafiltreringsmoduler, der ligeledes fremstilles af nævnte firma. Man kan også anvende membraner forhandlet af firmaet Amicon (USA) under handelsnavnet "Diaflo[®]", såsom membranerne "Diaflo PM 10" og "UM" (adskillelsesevne 10000) og "Diaflo UM 2" (adskillelsesevne 1000).

Betingelserne for ultrafiltreringen kan fastlægges af fagmanden. Det foretrækkes at cirkulere væsken gennem et ultrafiltreringsmodul, idet væsken bringes i kontakt med membranen ved en temperatur, der er nær ved omgivelsestemperaturen, og under et vist tryk, f.eks. 3 bar. Væsken, der cirkulerer gennem membranen, kan recirkuleres flere gange, indtil man opnår et koncentrat med et ønsket indhold af glycoproteiner og N-acetylneuraminsyre.

Til ekstraktion af N-acetylneuraminsyren underkastes koncentratet trin (c), der består i en hydrolyse, nærmere bestemt en sur hydrolyse med svovlsyre ved en koncentration på under 0,5 N.

For at forøge hydrolysehastigheden arbejder man ved en relativt høj temperatur, der dog ikke overskrider 98 °C. Anvendelsen af svovlsyre fører til dannelsen af sulfationer, der let kan separeres fra senere. For at lette tilsynskomsten af et bundfald ved hydrolysen afkøler man eventuelt reaktionsmediet stammende fra hydrolysen til ca. 4 °C. Herved kan man på kendt måde separere et bundfald fra overvæsken, f.eks. ved centrifugering. Bundfaldet fra hydrolysen elimineres, mens overvæsken opsamles. Overvæsken eller det hydrolyserede koncentrat underkastes en supplerende behandling i trin (d), hvorved man kan ekstrahere N-acetylneuraminsyren.

På dette stadium af behandlingen af mælkeserum fra oste eller caseinfremstilling anvendes i sig selv kendt teknik til opnåelse af N-acetylneuraminsyren. Man foretager først en neutralisation af overvæsken, der har til formål at udfælde endnu frie sulfationer, som er til stede i overvæsken, i form af salte. Denne operation foretages ved tilsætning af et overskud af bariumhydroxid. Man anvender et overskud af bariumioner, indtil man opnår en pH-værdi i omegnen af

neutralitet. Man fjerner derpå det dannede udfældede bariumsulfat og bevarer overvæsken. Denne koncentrerer eventuelt ved en ultrafiltrering. Derefter kan N-acetylneuraminsyren isoleres fra overvæsken eller ultrafiltratet på to måder. Man foretager enten en første passage gennem en kationbytterharpiks for at udøve en demineraliseringsvirkning på overvæsken. Man anvender f.eks. harpikser, der forhandles under betegnelsen "Dowex[®]", f.eks. af typen "AG 50 WX 8H +". Efter passagen gennem kationbytterharpiksen sendes produktet gennem en anionbytterharpikssøjle for at fiksere N-acetylneuraminsyren. Man kan med fordel anvende en harpiks, der forhandles under betegnelsen "Dowex[®]", type AG 1 X 8 formiat". N-acetylneuraminsyren opnås derpå ved eluering fra anionbytterharpiksen efter udvaskning af kolonnen med destilleret vand. Der anvendes til elueringen især myresyre, f.eks. 0,3 M myresyre, hvis den anvendte anionbytterharpiks er på formiatform.

Man opnår herved en opløsning, der ved lyofilisering fører til et pulver af N-acetylneuraminsyre af en ekstrem ren kvalitet.

Man kan også efter neutralisationen, frasepareringen af bariumsulfat og klaringen af overvæsken tørre denne, eventuelt efter passage gennem en kationbytterharpiks. Det opnåede pulver underkastes derpå en ekstraktion med et opløsningsmiddel, dvs. det optages i et opløsningsmiddel eller en opløsningsmiddelblanding, hvori N-acetylneuraminsyren er opløselig, f.eks. ethanol eller en blanding af acetone og vand. Den ekstraherede syre isoleres derpå efter eliminering af opløsningsmidlet.

Som nævnt kan det i trin (d) opnåede neutraliserede og klarede koncentrat inden isoleringen af N-acetylneuraminsyren om ønsket underkastes en ny ultrafiltrering ved passage gennem membraner med en adskillelsesevne på ca. 500 - 15000.

Det herved opnåede ultrafiltrat behandles derefter som beskrevet ovenfor til opnåelse af en yderst ren N-acetylneuraminsyre.

5 Når N-acetylneuraminsyren isoleres ved tørring af det neutraliserede koncentrat, opnås den i en mindre ren form.

Den herved opnåede N-acetylneuraminsyre, hvis fremstillingspris er lavere end prisen for den renere syre, kan være interessant til visse anvendelser, f.eks. inden for kosmetologien, hvor der ikke kræves en absolut renhed.

10 Renheden af den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede N-acetylneuraminsyre ligger mellem ca. 60 % og ca. 90 % og kan f.eks. være af størrelsesordenen 70 %. Fagmanden vil forstå, at det er muligt at variere denne renhedsgrad som funktion af mindst tre parametre, såsom:

15 Rensningsgraden for glycoproteinerne ved den første ultrafiltrering,

hydrolysekvaliteten, og

20 kvaliteten af membranerne ved den eventuelle anden ultrafiltrering, idet en lavere adskillelsesevne giver et tilsvarende renere ultrafiltrat.

En analyse af det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede produkt gav følgende resultater:

1. Fugtighed: 0,6 - 0,7%
 2. Papirchromatografi: Der blev eftervist en enkelt bestanddel, hvis identitet blev fastslået ved hjælp af det specifikke reagens for sialinsyrer (orcinol-reagens; Ehrlich's reagens), og som udviste en R_f -værdi svarende til værdien for N-acetylneuraminsyre.
- 25

3. Gaschromatografi: Der blev påvist to bestanddele:
- | | |
|----------------------|-----|
| N-acetylneuraminsyre | 98% |
| N-glycolneuraminsyre | 2% |
4. Optisk rotation: $[\alpha]_{589,2} = 31,90^\circ$ (Litteratur: -32°)
5. Spektralanalyse:
- a) Ultraviolet: I en 1% vandig opløsning opnår man et absorptionsspektrum, som er identisk med spektret af et kommercielt tilgængeligt produkt.
- b) Synligt: Absorptionsspektret for indfarvningen, der opnås ved hjælp af niazi- og State-reagenset for diphenylaminer, er identisk med spektret af et kommercielt tilgængeligt produkt.
6. Massespektroskopi: Der identificeredes to bestanddele:
- | | |
|----------------------|-----|
| N-acetylneuraminsyre | 98% |
| N-glycolneuraminsyre | 1% |

Desuden påvistes et ukendt stof, der udgjorde mindre end 1% af præparatet.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres under henvisning til tegningen, der viser to praktiske udførelsesformer af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, idet figur 1 viser fremstillingen af N-acetylneuraminsyre med høj renhed, mens figur 2 viser fremstillingen af N-acetylneuraminsyre med høj eller med mindre høj renhed (ca. 70%). Det skal bemærkes, at man som udgangsmateriale kan anvende enten mælkeserum fra ostefremstilling eller caseinfremstilling (B) eller rekonstitueret mælkeserum, opnået ud fra pulverformigt mælkeserum (B') ved tilsætning af vand. De forskellige fraktioner består af flokkulerede proteiner, der separeres fra efter flokkuleringen 1, og isoleret NANA, der som vist på figur 1 fås efter hydrolyse (6) af koncentratet og afkøling (7) til ca. 4 °C, og neutralisation af overvæsken (9) og passage af den klarede overvæske gennem en kationbytterharpiks (14) og en anionbytterharpiks (15) efterfulgt af en lyofilisering (18), eller som vist på figur 2 fås enten efter hydrolyse af koncentratet, ultrafiltrering, passage af

ultrafiltratet gennem en kationbytterharpiks og tørring og ekstraktion til udvinding af NANA med en renhed på ca. 70 % eller efter ultrafiltrering, passage gennem først en kationbytter og derefter en anionbytter, eluering og lyofilisering.

Opfindelsen illustreres nærmere ved nedenstående eksempler

EKSEMPEL 1

Man foretog på traditionel måde en løbning af 1000 liter komælk og opnåede således 900 liter flydende mælkeserum, der anvendtes som udgangsmateriale ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Man underkastede 900 liter flydende mælkeserum en opvarmning til 95 °C i 35 minutter for at flokkulere andre proteiner end sialoglycoproteinerne, hvorpå man ved centrifugering fraseparerede de således flokkulerede proteiner. Man bevarede den resulterende overvæske fra flokkuleringen, som optog et rumfang på 96 % af det oprindelige rumfang og indeholdt 173 g NANA.

Man indførte denne overvæske i et ultrafiltreringsmodul udstyret med en membran med en adskillelsesevne på 3000. Trykket over ultrafiltreringsmodulet var ca. 3 bar. Man opnåede således et koncentrat indeholdende den totale mængde glycoproteiner og 90 g NANA.

Med henblik på ekstraktion af N-acetylneuraminsyren underkaster man koncentratet en sur hydrolyse ved tilsætning af 0,1N svovlsyre, og man opretholder hydrolysebetingelserne ved 90 °C i 1 time. For at lette udfældningen afkøles reaktionsmediet til ca. 4 °C. Det er derpå let at fraseparere hydrolysebundfaldet, der elimineres, og over-

væsken, der bevares, og som indeholder 80 g NANA. Over-
væsken behandles derpå til neutralisation med en mættet
opløsning af bariumhydroxid til pH 7, hvorved der udfældes
bariumsulfat. Opløsningen klares, og man eliminerer det
5 dannede bariumsulfat. Man bevarer overvæsken, der indehol-
der 80 g NANA, og koncentrerer denne ved at reducere dens
rumfang 4 - 6 gange under vakuum ved hjælp af en rotations-
inddamper opvarmet til 45 °C, der fungerer ved et tryk på
20 - 300 mmHg. Den således koncentrerede overvæske ind-
10 føres med henblik på demineralisering i en kolonne, hvorpå
der er fyldt en kationbytterharpiks "Dowex[®] type AG 50 WX
8 H +". Man lader derpå produktet, der forlader kationbyt-
terkolonne, passere gennem en anionbytterkolonne af typen
"Dowex[®], type AG1 X 8 formiat", for at fikse NANA. Man
15 udvasker derpå kolonnen med anionbytterharpiks med destil-
leret vand, hvorpå man foretager eluering af NANA med 0,3 M
myresyre. Man udvinder således 70 % af det fikserede NANA;
ved lyofilisering af myresyreopløsningen opnår man 45 g
NANA i form af et ekstremt rent pulver. Den opnåede NANA
20 har nærmere bestemt en renhed på 98-99 % med et indhold på
1-2% N-glycolneuraminsyre.

Den fremstillede N-acetylneuraminsyre er et lyofiliseret
hvidt pulver, der er fuldstændigt opløseligt i vand under
dannelse af en farveløs klar opløsning.

25 EKSEMPEL 2

Man går frem som i eksempel 1, bortset fra at man anvender
1000 liter fåremælk, og man opnår i det væsentlige ækviva-
lente resultater. Renhedsgraden for den opnåede N-acetyl-
neuraminsyre er 98 - 99%.

30 EKSEMPEL 3

Man går frem som i eksempel 1, idet man dog går ud fra et

flydende mælkeserum, opnået ved regenerering af pulverformigt mælkeserum. Til dette formål anvendes 50 kg mælkeserumpulver, som man fortynder, til man opnår 900 liter flydende mælkeserum. Renheden af den opnåede N-acetylneuraminsyre er 98-99%.

EKSEMPEL 4

1000 liter mælkeserum flokkuleres ved opvarmning. Det klare filtrat, opnået ved centrifugering og filtrering, underkastes en ultrafiltrering gennem en membran "RP (Iris 3042)[®]". Det opnåede koncentrat (20 liter) indeholder 40 g/liter glycoproteiner.

Koncentratet hydrolyseres med 0,025N svovlsyre ved 90 °C i 25 minutter og neutraliseres ved 80 °C med et overskud af bariumhydroxid til pH 7 - 7,5.

15 Efter klaring underkastes opløsningen, efter at være befriet for bariumsulfatbundfald, en ultrafiltrering gennem en membran med en adskillelsesevne på 5000.

20 Det opnåede ultrafiltrat koncentrerer og ledes derpå gennem en kationbytterharpiks. Den opnåede opløsning tørres til opnåelse af 50 g sialinsyre (NANA) med en renhed på ca. 70%. I et andet forsøg ledes opløsningen gennem en anionbytterharpiks hvorefter den elueres og lyofiliseres. Herved opnår man 35 g yderst ren NANA, nærmere bestemt med en renhed på 98-99%.

P a t e n t k r a v :

1. Fremgangsmåde til fremstilling af N-acetylneuraminsyre ud fra mælkeserum fra oste- og/eller caseinfremstilling under anvendelse af ultrafiltrering, k e n d e t e g n e t
- 5 ved, at man
- (a) foretager en termisk flokkulering af mælkeproteinerne, bortset fra sialoglycoproteinerne, ved temperaturer under 100 °C til opnåelse af et første bundfald af flokkulerede proteiner og en første overvæske, der fra-
- 10 separeres og opsamles,
- (b) gennemfører en ultrafiltrering af den første overvæske gennem membraner med en adskillelsesevne på ca. 1000 - 15000, udtrykt som molekylvægt, til opnåelse af et koncentrat indeholdende glycoproteiner og N-acetylneur-
- 15 aminsyre,
- (c) foretager en sur hydrolyse af det opnåede koncentrat med svovlsyre ved en koncentration på under 0,5 N ved en høj temperatur, der dog ikke overskrider 98 °C, hvorpå man evt. afkøler det hydrolyserede koncentrat
- 20 til ca. 4 °C til dannelse af et andet bundfald og en anden overvæske, der separeres fra og opsamles, og
- (d) underkaster det hydrolyserede koncentrat eller den anden overvæske en neutralisation til udfældning af frie sulfationer i form af salte ved tilsætning af et
- 25 overskud af bariumhydroxid, eventuelt efterfulgt af en ultrafiltrering, hvorefter man enten lader overvæsken eller ultrafiltratet passere gennem en kationbytterhar-
- piks og derpå gennem en anionbytterharpiks og eluerer den fikserede N-acetylneuraminsyre, der om ønsket lyo-
- 30 filiseres, eller tørrer den neutraliserede og klarede

overvæske, evt. efter passage gennem en kationbytterharpiks, og bringer det således opnåede pulver i intim kontakt med et opløsningsmiddel eller en opløsningsmiddelblanding, hvori N-acetylneuraminsyren er opløselig, f.eks. ethanol eller en blanding af acetone og vand.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt ved, at den termiske behandling i trin (a) gennemføres ved ca. 95 °C i løbet af ca. 30 minutter.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, kendt ved, at man under trin (b) lader den flydende overvæske cirkulere gennem et ultrafiltreringsmodul, hvorved den bringes i kontakt med membranen ved en temperatur i nærheden af omgivelsestemperaturen og under et vist tryk, f.eks. 3 bar., idet væsken, der cirkulerer gennem membranen, om ønsket recirkuleres flere gange, til opnåelse af et koncentrat med et ønsket indhold af N-acetylneuraminsyre.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt ved, at det hydrolyserede koncentrat opnået i trin (c) ved afkøling til ca. 4 °C omdannes til et andet bundfald og en anden overvæske, der separeres fra og opsamles, og at behandlingen i trin (d) af den anden overvæske i det væsentlige omfatter en neutralisation, gennemledning af overvæsken gennem en kationbytterharpiks, fiksering af N-acetylneuraminsyre ved passage gennem en anionbytterharpiks, eluering af den således fikserede syre og udvinding af en ekstremt ren opløsning af N-acetylneuraminsyre, der om ønsket lyofiliseres.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt ved, at det hydrolyserede koncentrat, opnået i trin (c), neutraliseres ved en temperatur på ca. 50 - 80 °C, at den klarede opløsning underkastes en ultrafiltrering gennem membraner

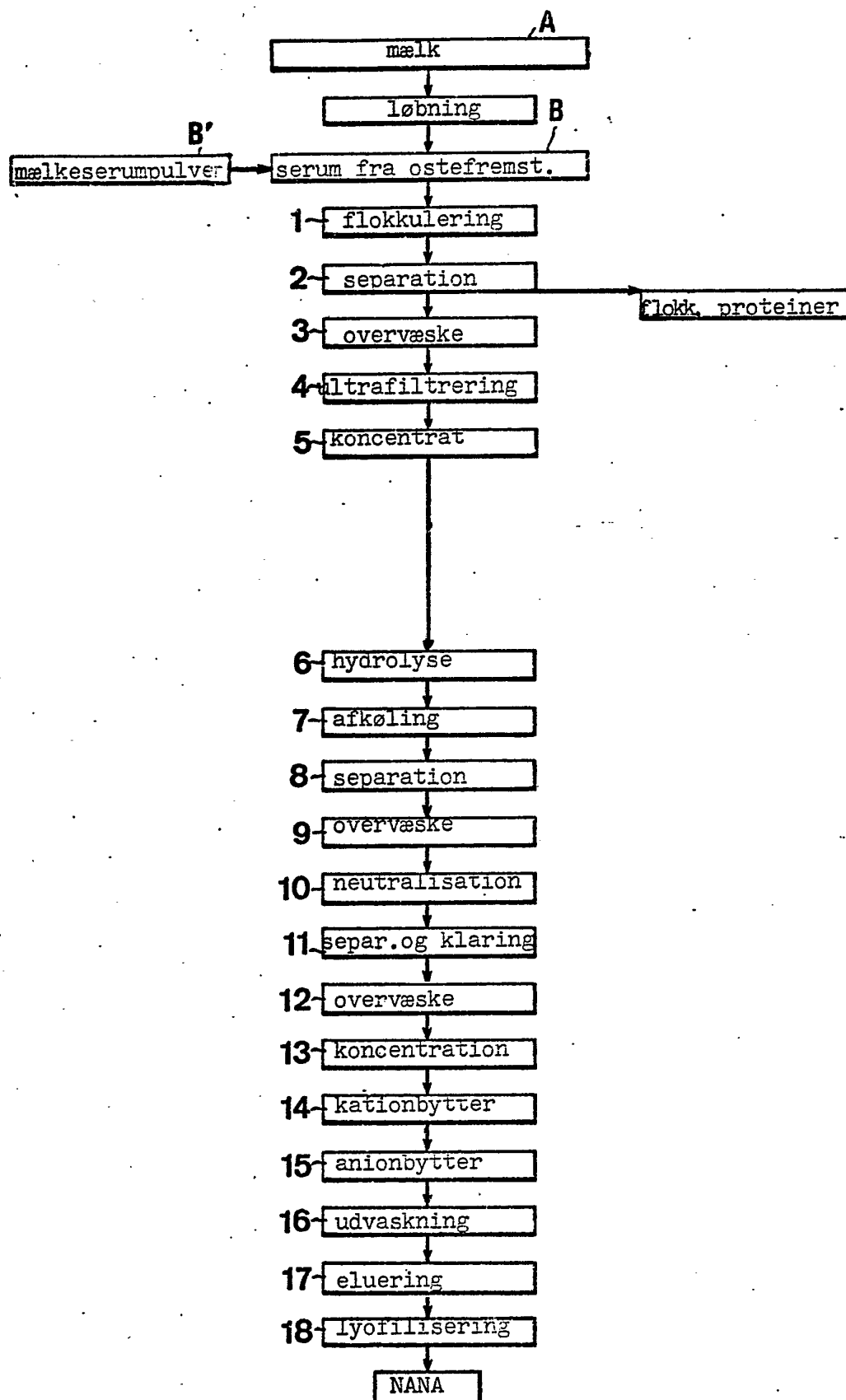
med en adskillelsesevne på ca. 500 - 15000, og at man udvindes N-acetylneuraminsyre fra det opnåede ultrafiltrat.

- 5 6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man under behandling (d) lader den neutraliserede og klarede overvæske eller det andet ultrafiltrat passere gennem en kationbytterharpiks og derpå gennem en anionbytterharpiks, hvorefter man udvasker anionbyttersøjlen og eluerer denne for at udvinde N-acetylneuraminsyre, der fikseres til harpiksen, idet elueringen f.eks. gennemføres
- 10 med myresyre, hvis den anvendte anionbytterharpiks er på formiatform.

Fremdragne publikationer:

Figur 1

148358



Figur 2

148358

