SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(21) Číslo prihlášky: **1142-94**

(22) Dátum podania: **22.09.94**

(31) Číslo prioritnej prihlášky: **P 43 32 464.9**

(32) Dátum priority: **24.09.93**

(33) Krajina priority: **DE**

(40) Dátum zverejnenia: **12.04.95**

(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: **06.08.99**

(86) Číslo PCT:

(11) Číslo dokumentu:

280 086

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl [6]:

C 07C 227/40
C 07C 229/08

(73) Majiteľ patentu: Degussa Aktiengesellschaft, Frankfurt am Main, DE;

(72) Pôvodca vynálezu: Yonsel Sems, Dr., Ing., Istinye-Istambul, TR;
Schäfer-Treffenfeld Wiltrud, Dr., Ing., Obertshausen, DE;
Richet Gérard, Ing. chem., Saint-Quentin, FR;
Le Quang Tien, Ing. chem., Ham, FR;
Sextl Elfriede, Dr., chem., Geiselbach, DE;
Scholz Mario, Dr., chem., Hanau, DE;

(54) Názov vynálezu: **Spôsob oddeľovania L-leucínu a L-izoleucínu**

(57) Anotácia:
Vodné roztoky obsahujúce L-leucín a L-izoleucín sa jeden alebo viackrát privedú pri hodnote pH < 7 do kontaktu so zeolitom, ktorý má modul od 2 do 1000, po následnej adsorpcii sa zeolit oddelí a adsorbované aminokyseliny sa desorbujú vodným roztokom s pH > 7.

Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobu oddeľovania L-leucínu a L-izoleucínu z vodných roztokov a oddeľovania týchto aminokyselín navzájom od seba.

Doterajší stav techniky

Leucín a izoleucín sú aminokyseliny, ktoré sa líšia usporiadaním CH-skupín v neutrálnom zvyšku.

Ďalšie vlastnosti je možné vidieť v tabuľke:

	L-leucín	L-izoleucín
Molová hmotnosť (g/mol)	131,17	131,17
izoelektrický bod	pH 8,98	pH 5,94
rozpustnosť (g/100 ml)	2,19	4,12

Zmesi, ktoré obe tieto aminokyseliny obsahujú, sa nachádzajú napríklad v proteínových hydrolyzátoch. Ako zo stavu techniky vyplýva, je značne ťažké oddeliť L-izoleucín od iných rozvetvených aminokyselín, ako L-leucín alebo L-valín (Ullmann, zv. A2, str. 70, 5. Vydanie, 1985).

Ako riešenia problému sa ponúkali napríklad frakcionovaná kryštalizácia hydrochloridov [JP-PS 39-1915 (1964)] alebo premena uvedených aminokyselín na soľ kobaltu a selektívna extrakcia príslušnej soli L-izoleucín alkoholmi z pevnej fázy [JP-PS 37-15118 (1962), ... citované podľa H. Samejima v „The Microbial Production of Amino Acids", Tokio 1972, str. 245 a str. 253].

Z nemeckej patentovej prihlášky P 42 17203.9 (európska patentová prihláška 93 105321.9) je síce známe, že aminokyseliny je možné použitím zeolitov z vodných roztokov oddeliť, ale nie je tu žiadny odkaz na oddelenie úzko príbuzných aminokyselín L-leucínu a L-izoleucínu navzájom.

Podstata vynálezu

Úlohou vynálezu je dať k dispozícii jednoduchší spôsob oddeľovania pre tieto dve aminokyseliny.

Predmetom vynálezu je spôsob na oddeľovanie L-leucínu a L-izoleucínu z vodných roztokov, obsahujúcich tieto aminokyseliny, a ich oddeľovanie navzájom, ktorý sa vyznačuje tým, že sa vodné roztoky prípadne viackrát privedú pri hodnote pH < 7 do kontaktu so zeolitom, ktorý má modul od 2 do 1000, najmä 2 až 200, po následnej adsorpcii sa zeolit oddelí a adsorbované aminokyseliny, ktorých hlavný podiel tvorí L-leucín, sa desorbujú vodným roztokom, ktorého hodnota pH je nastavená na hodnotu > 7.

Adsorpcia sa uskutočňuje prednostne v oblasti hodnôt pH medzi 1,0 a < 7,0, prednostne 1 a 6, pričom sa hodnota pH roztokov nastavuje napríklad kyselinou chlorovodíkovou alebo kyselinou sírovou.

V roztoku so zmesou leucínu a izoleucínu, prípadne ďalšími neutrálnymi aminokyselinami, je adsorpčné nasýtenie leucínu vyššie ako izoleucínu. Zostáva tak roztok s pomerne zvýšenou koncentráciou izoleucínu, zatiaľ čo leucín je adsorbovaný na pevnej látke a ľahko sa môže oddeliť.

Desoprcia nastáva nastriekaním zeolitu alkalickým roztokom, ako napríklad vodným amoniakovým roztokom. Desorpcia sa uskutočňuje v alkalickej oblasti, pH >7, prednostne pri pH 8 až 11.

Desorpčný roztok obsahuje, v závislosti od nastavenej hodnoty pH, všeobecne nad 90 % adsorbovaného množstva leucínu.

Opakovanými cyklami adsorpcie a desorpcie, prípadne optimalizáciou hodnoty pH pri adsorpcii a desorpcii, môžu byť leucín a izoleucín tak oddelené, že sa v alkalickom desorpčnom roztoku nachádza výlučne leucín a v kyslom zásobnom roztoku izoleucín.

Spôsob sa uskutočňuje v teplotnom rozmedzí medzi 15 a 60 °C bez toho, aby bola kinetika podstatne ovplyvnená teplotou. Vo všeobecnosti sa pohybuje koncentrácia aminokyselín v roztokoch až po danú hranicu rozpustnosti.

Obzvláštny význam majú však roztoky s obsahom 10 až 16 g/l L-leucínu a 4 až 7 g L-izoleucínu.

Hydrolyzáty získané z prírodných minerálií ako prasačích štetín, rohoviny alebo pod. obsahujú totiž vždy podstatne viac L-leucínu ako L-izoleucínu (Ullmann, 5. vydanie, Amino Acids, zv. A2, str. 57).

Prednostne sa používajú zeolity typu A, X, najmä Y, DAY, mordenit, dealuminovaný mordenit, ZSM-5, dealuminovaný ZSM-5, Beta, VPI-5.

Obzvlášť vhodný je typ ZSM-5 v H- alebo Na-forme s modulom od 2 do 100 (pod modulom sa rozumie molový pomer SiO_2 k Al_2O_3). Podľa potreby sa používajú zeolity v práškovej forme alebo tvarované.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1: Použitie rozličných typov zeolitov

Boli použité nasledujúce typy zeolitov vo forme prášku, pričom podmienky kalcinácie nemajú žiadny výhradný charakter.

	SiO_2/Al_2O_3	Si/Al	Kalcinácia /°C/	/h/
Mordenit	30	15	550	1
H-ZSM-5	45	23	550	1
DAY	200	100	950	1

Pripravil sa syntetický roztok s 15,2 g/l L-leucínu a 6,5 g/l L-izoleucínu a asi 30 ml tohto roztoku sa priviedlo do styku s asi 3 g zeolitového prášku v 100 ml banke. Hodnota pH sa nastavila kyselinou chlorovodíkovou na pH 1 a banka sa 20 hodín pri 21 °C pretrepávala. Po následnej adsorbcii bol zvyšok filtrovaný a analyzovaný. Pomocou analýzy koncentrácií aminokyselín pred (C_0) a po (C_f) adsorpcii, ako aj znalosti koncentrácie adsorbentu (C_z) = g zeolit/aminokyselinový roztok sa určí nasýtenie zeolitu:

$$X = \frac{(C_0 - C_f)}{C_z} \ (\%)$$

Boli dosiahnuté nasledujúce adsorpčné nasýtenia:

Zeolit	$X_{L\text{-leucín}}$ (%)	$X_{L\text{-izoleucín}}$ (%)
H-ZSM-5/M45	4,2	0,32
Mordenit	2,28	0,97
DAY	1,92	0,86

Príklad 2: Oddelenie L-leucínu a L-izoleucínu s H-ZSM-5(M28)

Adsorpčné experimenty sa vykonali v pretrepávaných bankách so zeolitmi v práškovom stave. Tu použitý zeolit, H-ZSM-5 má modul (pomer SiO_2/Al_2O_3) 28 a kalcinoval sa 1 hodinu pri 550 °C.

Pripravil sa roztok aminokyselín s 15,6 g/l L-leucínu a 6,6 g/l L-izoleucínu. 89,5 ml tohto roztoku sa priviedlo do kontaktu s 30,98 g zeolitu H-ZSM-5 modul 28, v práškovej forme v 300 ml banke a pH hodnota sa nastavila pomocou HCl na 2,5. Banka sa pretrepávala pri 21 °C cez noc (asi 20 h), presah sa filtroval a pomocou HPLC-zariadenia analyzoval. V presahu bolo po adsorpcii 0,3 g/l L-leucínu a 5,7 g/l L-izoleucínu.

Pred adsorpciou sa nachádzalo v 89,5 ml roztoku celkom 1,99 g aminokyselín, z toho bolo 30 % L-izoleucínu a 70 % L-leucínu. Po adsorpcii zostalo v roztoku dohromady 0,54 g aminokyselín. L-izoleucín má pritom podiel 95 % a L-leucín len 5 %. Podiel L-izoleucínu na zeolite bol 5 % (s 0,07 g) a podiel L-leucínu 95 % (s 1,35 g).

Príklad 3: Oddelenie L-leucínu a L-izoleucínu zo zmesi od ďalších neutrálnych aminokyselín

400 ml roztoku obsahovalo vedľa 5,68 g leucínu, 3,44 g izoleucínu ďalšie aminokyseliny (metionín valín, alanín, glycín, fenylalanín) s podielom dohromady 10 %, vzhľadom na celkové množstvo aminokyselín.

Tento roztok sa viedol cez stĺpec so 40,54 g tvarovaných výrobkov zeolitu (H-ZSM-5, modul 45). Hodnota pH bola nastavená pomocou HCl na pH 1. Experiment prebiehal pri izbovej teplote asi 20 hodín. V presahu bolo po adsorpcii 5,2 g leucínu a 3,24 g izoleucínu. Nasýtenia predstavovali na 1,2 % pre leucín a 0,5 % pre izoleucín.

Stĺpec sa vyprázdnil, premyl vodou a desorboval vodným roztokom amoniaku. Hodnota pH sa počas desorpcie korigovala na pH 9,7. Po desorpcii sa v roztoku opäť nachádzalo 0,44 g leucínu a 0,12 g izoleucínu. Teda mohlo byť 92 % leucínu a 61 % izoleucínu zo zeolitu desorbovaných.

Príklad 4: Oddelenie leucínu a izoleucínu prostredníctvom adsorpcie a desorpcie

Experimenty sa vykonávali v pretrepávaných bankách pri teplote miestnosti so zeolitmi v práškovej forme. Použili sa H-ZSM5 modul 28 a H-ZSM5 modul 45.

		H-ZSM5 modul 28	H-ZSM5 modul 45
Koncentrácia vo východiskovom roztoku	L-LEU	10 g/l	10 g/l
	L-ILE	10 g/l	10 g/l
Pomer LEU/ILE		1:1	1:1
Navážok zeolitového prášku		23,9 g	24,1 g
Navážok roztoku		232,5 g	252,5 g
Adsorpcia pri pH 5			
Koncentrácia v roztoku po adosorpcii	L-LEU	4,6 g/l	6,5 g/l
	L-ILE	9,2 g/l	9,6 g/l
Nasýtenie zeolitu s	L-LEU	1,25 g	0,88 g
	L-ILE	0,18 g	0,05 g
Nasýtenie vzhľadom na hmotnosť zeolitu	L-LEU	5,25 %	3,65 %
	L-ILE	0,78 %	0,21 %
Pomer LEU/ILE		6,7:1	17,4:1

Nasýtený zeolit sa oddelil, viackrát premyl a vysušil. Potom bol použitý na desorpčné experimenty.

Navážok zeolitového prášku		6,54 g	6,03 g
Navážok desorpčného roztoku (H_2O)		62,7 g	61,2 g
Desorpcia pri pH 10			
Koncentrácia v desorpčnom roztoku	L-LEU	5,25 g/l	3,65 g/l
	L-ILE	0,65 g/l	0,20 g/l
Desorbované množstvo	L-LEU	0,33 g	0,22 g
	L-ILE	0,041 g	0,012 g
Desorbované množstvo vzhľadom na zeolity	L-LEU	5,05 %	3,65 %
	L-ILE	0,68 %	0,21 %
Pomer LEU/ILE		7,4:1	17,4:1

Pokusy ukazujú, žc adsorpciou nastáva výrazné nakoncentrovanie leucínu. Zatiaľ čo vo východiskovom roztoku sú L-leucín a L-izoleucín v pomere 1:1, nachádza sa po desorpcii v desorbovanej kvapaline pomer 7,4:1 (modul 28), prípadne do konca 17,4 : 1 (modul 45).

Inak toto znamená na vyčistenie L-leucínu pri použití typu ZSM5/M45 nasledovné

čistota vo východiskovom roztoku	50 %
čistota po 1. oddeľovacom kroku (adsorpcia + desorpcia):	94,5 %
čistota po 2. oddeľovacom kroku (adsorpcia + desorpcia)	99,6 %

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob oddeľovania L-leucínu a L-izoleucínu z vodných roztokov, obsahujúcich tieto aminokyseliny, a ich oddeľovanie od seba navzájom, **vyznačujúci sa tým**, žc sa vodné roztoky jeden alebo viackrát privedú pri hodnote pH < 7 do kontaktu so zeolitom, ktorý má modul od 2 do 1000, po následnej adsorpcii sa zeolit oddelí a adsorbované aminokyseliny sa vodným roztokom, na hodnotu pH > 7 nastavenom, desorbujú.

2. Spôsob podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že adsorpcia nastáva v oblasti pH medzi 1 a < 7,0.

3. Spôsob podľa nárokov 1 a 2, **vyznačujúci sa tým**, že desorpcia nastáva v oblasti pH medzi 8 a 11.

4. Spôsob podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 3, **vyznačujúci sa tým**, že sa používajú zeolity typov A, X, Y, DAY, mordenit, dealuminovaný mordenit, ZSM-5, dealuminovaný ZSM-5, Beta, VPI,5.

5. Spôsob podľa nároku 4, **vyznačujúci sa tým**, že sa používa typ ZSM-5 v H- alebo Na-forme.

6. Spôsob podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 5, **vyznačujúci sa tým**, že roztok obsahuje ďalšie neutrálne aminokyseliny.

Koniec dokumentu