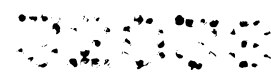


P0302864

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNYK
PÉLDÁNY



77.259/SM

KIVONAT

A2

Eljárás enantiomerben dúsított aminosavak előállítására

DSM IP Assets B.V., Het Overloon 1, 6411 TE Heerlen, NL

A bejelentés napja: 2002. 01. 31.

Elsőbbsége: 2001. 01. 31. (1017250 NL)

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/NL02/00072

A nemzetközi közzététel száma: WO02/061107

D, Entor
mavén

2005.09.06.

Id. old. magán.
diff.

le!

A találmány tárgya eljárás a D-enantiomerben dúsított királis aminosavak előállítására, amely eljárásban a megfelelő N-karbamoil-aminosavat D-karbamoilázzal érintkeztetjük ammónia felszabadulása mellett, az ammóniát kétértékű fémnek foszfáttal, monohidrogén-foszfát-ionnal vagy dihidrogén-foszfát-ionnal képezett sójával eltávolítjuk. Egy kivitelben az enzimes dekarbamoilezést az előbbi foszfátsók jelenlétében végezzük. Egy másik kivitelben a reakcióelegyet egy külső hurokban, a jelenlévő szilárd anyag eltávolítása után hozzuk érintkezésbe az előbbi foszfátsóval. A D-enantiomerben dúsított királis aminosavat úgy is előállíthatjuk, hogy a megfelelő hidantoin származékot hidantoinázzal a megfelelő N-karbamoil-aminosavvá alakítjuk át, amelyet ezután a találmány szerint átalakítunk D-enantiomerben dúsított aminosavvá.

2005.10.02.

Ill. al. : 0



77.259/SM

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

A2

Eljárás enantiomerben dúsított aminosavak előállítására

DSM IP Assets B.V., Het Overloon 1, 6411 TE Heerlen, NL

Feltalálók:

Boesten Wilhelmus Hubertus Joseph, Brountsiaan 9, 6132 BJ Sittard, NL

Kierkels Joannes Gerardus Theodorus, Margrietlaan 17, 6133 BH Sittard, NL

A bejelentés napja: 2002. 01. 31.

Elsőbbsége: 2001. 01. 31. (1017250 NL)

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/NL02/00072

A nemzetközi közzététel száma: WO02/061107

A találmány tárgya eljárás D-enantiomerben dúsított aminosavak előállítására, amely eljárásban a megfelelő N-karbamoil-aminosav enantiomerjeinek elegyét D-karbamoilázzal érintkeztetjük, miközben ammónia szabadul fel.

A D-aminosavak a biológiailag aktív készítmények, úgy mint β -laktám antibiotikumok, peptidhormonok és peszticidek fontos építőkövei. E "nem-természetes" aminosavak előállítására szokásosan olyan eljárást alkalmaznak, amely során a megfelelő DL-5-szubsztituált hidantoin származékot enantioszelektív módon hidantoinázzal hidrolizálják, és így a megfelelő N-karbamoil-aminosavat kapják. Ezt az N-karbamoil-aminosavat enzimes úton a megfelelő D-aminosavvá alakíthatják át.

Az ismert eljárásnak az a hátránya, hogy egy bizonyos reakcióidő alatti megvalósításhoz viszonylag nagy mennyiségű biokatalizátor szükséges, minthogy általánosan ismert, hogy azt az enzimet, amely a karbamoil-aminosavak hidrolíziséért felelős (a karbamoilázt, amelyet N-karbamoil-D-aminosav-amidohidroláznak is neveznek), erőtel-

jesen gátolja az ammónia reakciótermék. Több közlemény [Olivieri et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 2173-2183 (1981); Runser, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33, 382-388 (1990); Louwrier, *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 562-571 (1996)] arról számol be, hogy az a koncentráció, amelynél ammónia által okozott inhibíció következik be, igen alacsony ($\sim 10\text{mM}$). Az ismert eljárásokra nézve ez azt jelenti, hogy 10mM ammónia koncentráció esetén a karbamoiláz a maximális reakciósebesség felének megfelelő aktivitást mutat. Ha az ammónia koncentrációja 20mM , a karbamoiláz aktivitása a maximális aktivitásnak csak az $1/3$ -a. Nyilvánvaló, hogy ipari szempontból releváns körülmények között, amikor is nagy termékkoncentrációt, például 500mM -nál nagyobb koncentrációt kívánunk elérni, a karbamoiláz által katalizált folyamat igen erősen gátolva lesz. Kisebb termékkoncentrációk azonban (10mM nagyságrendben), amelyeknél a karbamoiláz aktivitása csaknem a maximális érték, gazdasági szempontból nem vonzóak, minthogy kis kapacitással eredményezik a terméket.

A szakirodalom különféle eljárásokat ismertet, amelyeknek az a célja, hogy alacsony értéken tartsák az ammónia koncentrációját az enzimes átalakítás során. Az ammóniának *in situ* eltávolítására mutat be példát Kim és Kim *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 63-67 (1995) közleménye, amely szerint egy adszorbenst (AD300NS-t, amely a japán Tomita Pharmaceutical Co. cég szilikát komplexe) használták fel az ammónia eltávolítására egy olyan eljárásban, melyben D-(p-hidroxi-fenil)-glicint állítottak elő hidantoináz és karbamoiláz alkalmazásával. Ennek az eljárásnak az a hátránya, hogy az adszorbens drága, és ezért újra kell hasznosítani.

Egy másik eljárásban, amelyet a J 61. 285.996-A (1986) szabadalmi bejelentés ismertet, a keletkezett ammóniát desztillációval távolítják el. Ez az eljárás azonban csak akkor hatékony az ammónium eltávolítására, ha a reakcióelegy pH-ja nagy érték. Ilyen nagy pH értékek esetén viszont a karbamoiláz enzim nem aktív. Ha az ammóniát semleges pH-n, tehát $\text{pH}=7-7,5$ értéken távolítják el desztillációval, a keletkezett ammóniá-



nak 60-90%-a marad vissza a reakcióelegyben még akkor is, ha a reakcióelegy térfogatának több mint 90%-át eltávolítják. Így tehát semleges pH-n nem oldható meg az ammónia hatékony eltávolítása.

A találmány olyan egyszerű és gazdaságilag vonzó eljárásra vonatkozik, amelyet kisebb mennyiségű biokatalizátor felhasználásával vagy rövidebb reakcióidő alatt végezhetünk el.

A találmány szerint ezt úgy érjük el, hogy az ammóniát kétértékű fémnek foszfáttal, monohidrogén-foszfát-ionnal vagy dihidrogén-foszfát-ionnal alkotott sója (a továbbiakban röviden foszfátsónak nevezzük) alkalmazásával távolítjuk el. Ebből a célból az enzimes reakciót például kivitelezhetjük foszfátsó jelenlétében. Meglepő módon azt találtuk továbbá, hogy a reakcióelegy könnyen keverhető maradt még nagy zagykoncentrációk esetén is.

Egy másik kivitelben úgy járunk el például, hogy a reakcióelegyet az oldhatatlan reakciókomponensek eltávolítása után átvezetjük egy hurkon, így például egy második reaktoron vagy egy oszlopon vagy egy szűrőn, amelyben foszfátsó van jelen. A reakcióelegyben lévő ammónia ekkor a foszfátsóhoz kötődik, így a megfelelő ammónium-foszfátsó keletkezik, ezután pedig a megmaradó folyadékot, amely még mindig tartalmaz például enzimet, visszavezetjük abba a reakcióedénybe, amelyben az enzim által katalizált dekarbamoilezést végezzük.

Felismertük, hogy így az enzim nem vagy sokkal kisebb mértékben gátlódik. Ez még meglepőbb, minthogy ismert, hogy a kétértékű fémek még kis koncentrációban is (1-10 μ mólos koncentrációban is) zavarhatják a karbamoiláz katalizálta reakciókat.

Alkalmas kétértékű fémionok például a magnézium-, kobalt-, kalcium-, mangán-, cirkónium- vagy ruténiumionok. Gazdaságossági okokból előnyösen magnézium-monohidrogén-foszfátot ($MgHPO_4$) alkalmazunk, melyet magnézium-hidrogén-



foszfátnak is nevezünk. Az $MgHPO_4$ összhangban van az optimális eljárási körülményekkel az eredményezett pH tekintetében, és könnyen előállítható olcsó nyersanyagokból. A foszfátsót in situ is képezhetjük.

A foszfátsót, például az $MgHPO_4$ -ot, egyszerűen állíthatjuk elő úgy, hogy foszforsavat adunk a megfelelő oxidhoz vagy hidroxidhoz, például magnézium-oxidhoz vagy -hidroxidhoz, és így foszfátsót kapunk. A foszfátsót ezt követően (adott esetben szűrés és mosás után) a reakcióelegyhez adagoljuk.

A felhasználandó foszfátsó mennyisége előnyösen 0,5-3 foszfátsó ekvivalens, különösen 0,8-1,2 ekvivalens a reakció során keletkezett ammónia mennyiségére vonatkoztatva.

A találmány szerinti eljárásban felhasználható enzimek például a hidantoináz-karbamoiláz eljárásban szokásosan alkalmazott enzimek, például azok, amelyek eredete a következő: *Pseudomonas*, különösen *Pseudomonas fluorescens*, *putida* vagy *desmolytica*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, különösen *Bacillus brevis* vagy *Bacillus stearothermophilus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Artrobacter*, *Agrobacterium*, különösen *Agrobacterium tumefaciens* vagy *radiobacter*, *Acrobacter*, *Klebsiella*, *Saracina*, *Protaminobacter*, *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Pichia* vagy *Paecilomyces*.

Az enzimes reakciót pH=5 és pH=9 közötti értéken végezhetjük el, előnyösen olyan pH-n, amely 6 és 8 közötti érték. Az a hőmérséklet, amelyen az enzimes reakciót végezzük, előnyösen 0°C és 50°C között, különösen 20°C és 40°C között van.

Ha az enzimes reakció végbement, a reakcióelegyet különféle módon dolgozhatjuk fel.

A termék kinyerésének alkalmas módja például egy olyan eljárás, amelyben a reakcióelegyet pH=0 és pH=3 közötti értékig, előnyösen pH=0,5 és pH=1,5 értékig megsavanyítjuk, majd a biomasszát eltávolítjuk. Ha ezután a pH-t például 3 és 5 közötti

értékre, előnyösen pH=3,5 és pH=4,5 közötti értékre emeljük, a D-aminosavat elválaszthatjuk például szűréssel vagy centrifugálással. Ha a pH-t 5 és 11 közötti értékre, előnyösen pH=7 és pH=10 közötti értékre emeljük, a foszfátsóból keletkezett megfelelő ammónium-foszfátsót választhatjuk el például centrifugálással vagy szűréssel.

A reakcióelegy feldolgozásának egy másik alkalmas módja abban áll, hogy a pH-t 9 és 11 értékek közé, előnyösen 9,5 és 10,5 értékek közé emeljük, és ezután a foszfátsóból keletkezett megfelelő ammónium-foszfátsót szűréssel eltávolítjuk. Az így kapott anyalúgból ezután például mikroszűréssel vagy ultraszűréssel távolítjuk el a biomasszát. Az anyalúgot például 3 és 6 közötti értékig előnyösen 4,5 és 5,5 közötti pH értékig megsavanyítjuk, majd a szilárd D-aminosavat például szűréssel elkülönítjük.

A keletkezett ammónium-foszfátsót ezután ismert módon, egyszerűen alakíthatjuk át a foszfátsóvá úgy, hogy az ammónium-foszfátsót szárazon hevítjük, és eközben ammónia szabadul fel. Egy másik eljárás szerint az ammónium-foszfátsó iszapot (zagyot) pH > 8,5 értéken, különösen 9 és 11 közötti pH értéken hevítjük, és eközben ammónia szabadul fel. Egy további eljárás szerint a magnézium-ammónium-foszfátsót ásványi savval, például kénsavval mossuk úgy, hogy a pH-t 4,5 és 6,5, előnyösen pH=5,5 és pH=6 közötti értéken tartjuk. Ennek megfelelően az ásványi sav ammóniumsóját kapjuk és magnézium-hidrogén-foszfátot nyerhetünk ki.

Az 1984-ben benyújtott US-A-4,460,555 és az 1985-ben benyújtott US-A-4,650,857 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentések specifikus magnézium-hidrogén-foszfát részecskéket ismertetnek, amelyek alkalmasak ammónia eltávolítására. Ezek a szabadalmi bejelentések különösen kitérnek arra, hogy e részecskéket olyan enzimes dialízis rendszerekben alkalmaznak, amely rendszerek karbamidnak ureázzal való eltávolítására szolgálnak, és e részecskék a karbamidból felszabaduló ammóniát fogják be. A felszabaduló ammónia összmenyisége azonban ezekben az esetekben viszonylag csekély. E bejelentések óta azonban még sohasem

javasolták ilyen részecskék felhasználását hidantoináz/karbamoiláz katalizálta eljárásokban azzal a céllal, hogy megelőzzék az enzim inhibícióját.

A találmány szerinti eljárás különösen alkalmas enantiometikusan dúsított aminosavaknak az úgynevezett hidantoin úton való előállításában való felhasználására; amely eljárás során D-enantiomerben dúsított N-karbamoil-aminosavat állítunk elő a megfelelő hidantoinból hidantoinázt adott esetben racemázzal kombinációban alkalmazva, majd D-karbamoilázzal dekarbamoilezést végzünk, ahol a dekarbamoilezés a teljes folyamat reakciósebességét meghatározó lépés. Felismertük, hogy foszfátsók és/vagy ammónium-foszfátsók jelenlétének nincs inhibeáló vagy denaturáló hatása a hidantoinázra, karbamoilázra és/vagy racemázra.

Az ismert eljárásokban ezeket az átalakításokat többnyire 7 és 8 közötti pH értékeken végzik, minthogy nagyobb pH értékek esetén gyakorlatilag teljes enzimgátlás lép fel az NH_3 jelenléte miatt. Ha a reakciókat körülbelül semleges pH-n végezzük, akkor az a hátrány jelentkezik, hogy szinte valamennyi aminosav és különösen az alifás aminosavak előállítása során fellép a visszamaradó hidantoin enantiomer lassú racemizációja.

Felismertük, hogy ha a reakciókat a találmány szerinti nagyobb pH-n, például 7,0 és 9,0 közötti, előnyösen 7,5 és 8,5 közötti pH-értékeken végezzük, szinte egyáltalán nem lép fel enzimgátlás, ugyanakkor bekövetkezik a nem kívánt enantiomer racemizációja. Ennek következtében olyan hozamot érhetünk el, ami sokkal nagyobb mint az 50%, ami az elméletileg lehetséges maximum racemizáció nélkül.

A találmány szerinti eljárást olyan rezolválási folyamatokban is felhasználhatjuk, amelyekben DL-N-karbamoil-aminosavat alakítunk át a D-enantiomerben dúsított megfelelő aminosavvá és az enantiomerben dúsított nem konvertált L-N-karbamoil-aminosavvá olyan mikroorganizmus alkalmazásával, amely D-szelektív, hidantoint hidrolizáló és N-karbamoil-aminosavat hidrolizáló enzimet tartalmaz. Minthogy a reakci-



ót emelt pH-n (például 7,5 és 9 közötti pH értéken) végezhetjük, kisebb lesz az L-N-karbamoil-aminosav veszteség, ugyanis emelt pH értéken nem megy végbe a hidantoináz katalizálta reakció.

I. Példa

34 g DL-(p-hidroxi-fenil)-glicin-hidantoin és 34 g $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -t adagolunk 200 ml vízbe. A reakcióelegy pH-ját 7,2 értékre állítjuk be 5 n NaOH adagolásával, majd a reakciót 34 ml *Agrobacterium radiobacter* sejtszuszpenzió hozzáadásával megindítjuk. A reakciót nitrogénatmoszférában, 40°C-on végezzük. A reakcióelegy pH-ját 5n NaOH-oldat hozzáadásával állandó 7,2 értéken tartjuk. HPLC analízissel meghatároztuk, hogy 99%-nál nagyobb konverziót értünk el már 10 órás hidrolízis után.

1. Összehasonlító példa

Az 1. példában leírt reakciókörülményekkel összehasonlítható feltételek mellett hidrolizálunk 34 g DL-(p-hidroxi-fenil)-glicin-hidantoin, azonban úgy, hogy a reakcióelegyhez nem adunk foszfátsót. A reakciót 34 ml azonos *Agrobacterium radiobacter* sejtszuszpenzióval indítjuk be. A reakciót nitrogénatmoszférában, 40°C-on végezzük. A reakcióelegy pH-ját konstans 7,2 értéken tartjuk 1,3 mólos H_3PO_4 -val végzett automata titrálással. Szabályos időközönként HPLC analízissel ellenőrizzük a reakció előrehaladását. Körülbelül 10 órás hidrolízis után körülbelül 57%-os konverziót regisztráltunk. A konverzió mértéke 30 óra után meghaladta a 99%-ot.

II. Példa

DL-(p-hidroxi-fenil)-glicin-hidantoin hidrolízisét úgy végezzük el, hogy e vegyület 122 g-ját 122 g $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -val együtt 575 ml vízbe adagoljuk. Ennek az elegynek a pH-ját 7,2 értékre állítjuk be 5n NaOH adagolásával, ezután nitrogéngázt vezetünk át



rajta 1 órán át. Az enzimes átalakítást 8 ml *Agrobacterium radiobacter* sejtszuszpenzió adagolásával indítjuk meg. A reakcióelegy pH-ját állandó 7,2 értéken tartjuk 25 tömeg%-os NaOH-oldat adagolásával. Összesen 19 g NaOH fogyást regisztráltunk. 95 órás hidrolízis után 99,3%-os konverziót határoztunk meg.

2. Összehasonlító kísérlet

A II. példában leírt kísérleti körülményekhez hasonlóan eljárva 122 g (p-hidroxifenil)-glicin-hidantoint adunk 575 ml vízhez 40°C-on. A pH-t 7,2 értékre állítjuk be 5n NaOH-oldat adagolásával, majd 1 órán keresztül vezetünk át nitrogéngázt az oldaton. A reakciót úgy indítjuk el, hogy *Agrobacterium radiobacter* azonos sejtszuszpenziójának 30 ml-ét adjuk az oldathoz. A pH-t 33 tömeg %-os H₃PO₄ adagolásával 7,2 értéken tartjuk. 95 órás hidrolízis után 98,7 %-os konverziót határoztunk meg. A 97,5 órás hidrolízis után mért konverzió volt 99,3%-os.

III. Példa

40°C-on 176 g DL-(p-hidroxifenil)-glicin-hidantoint és 176 g MgHPO₄·3H₂O-t adagolunk 510 ml vízhez. A reakcióelegyet 1 órán át tartó nitrogéngáz bevezetéssel tesszük inertté. Az enzime átalakítást 15 ml *Agrobacterium radiobacter* sejtszuszpenzió adagolásával indítjuk meg. A reakcióelegy pH-ját állandó 7,2 értéken tartjuk 5n NaOH-oldattal végzett automatikus titrálással. HPLC analízissel azt állapíthattuk meg, hogy 120 órás hidrolízis után 99,8 %-os volt a konverzió.

3. Összehasonlító kísérlet

40°C-on 176 g DL-(p-hidroxifenil)-glicin-hidantoint adunk 557 ml vízhez, és az elegy pH-ját 7,2 értékre állítjuk be 5n NaOH oldat adagolásával. Ezt a reakcióelegyet úgy tesszük inertté, hogy 1 órán keresztül vezetünk át nitrogéngázt rajta. Az előbbivel



azonos *Agrobacterium radiobacter* sejtuszuspenzió 56 ml-ét adjuk az elegyhez. A reakcióelegy pH-ját úgy tartjuk állandó pH=7,2 értéken, hogy 33 tömeg %-os H_3PO_4 -oldattal automatikus titrálást végzünk. HPLC analízissel megállapíthattuk, hogy a konverzió 146,5 óra után 96,5%-os, 180 óra után pedig 99,8%-os volt.

IV. Példa

A II. példában leírt módon nyert reakcióelegyet pH=1 értékre megsavanyítjuk körülbelül 130 g (98 tömeg%-os) H_2SO_4 hozzáadásával, ezután a sejtmaradékot mikroszűréssel eltávolítjuk. A visszamaradt anyagot 100 g vízzel diaszűrjük (diafilter). Az összegyűjtött vizes fázisokat részlegesen bepároljuk úgy, hogy a térfogata körülbelül 600 ml legyen. Körülbelül 63 g (50 tömeg%-os) NaOH-oldatot adunk az így kapott maradékhoz, amíg az elegy pH-ja eléri a 3,5 értéket, majd a keletkezett D-(p-hidroxi-fenil)-glicint elválasztjuk, és néhányszor mossuk. Az e lépésben kapott szüredékhez körülbelül 53 g (50 tömeg%-os) NaOH-oldatot adunk, amíg a pH értékét 8,5-re állítjuk be, ezután elválaszthatjuk a keletkezett MgNH_4PO_4 -ot.

A MgNH_4PO_4 -ot kétszer mossuk 50-50 ml vízzel, majd vízben szuszpendáljuk. Ezután a víz és ammónia elegyet csökkentett nyomáson lepároljuk.

Végül 101,7 g D-(p-hidroxi-fenil)-glicint és 118 g $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -t kapunk.

V. Példa

A II. példában leírt módon nyert reakcióelegy pH-ját pH=10 értékre állítjuk be körülbelül 70 g (50 tömeg %-os) NaOH-oldat adagolásával. A reakcióelegyet leszűrjük, majd a maradékot kétszer mossuk 100-100 ml vízzel. Az e lépésben kapott szüredéket mikroszűrő berendezésen engedjük át, hogy eltávolítsunk minden sejtmaradékot. A visszamaradt anyagot néhányszor mossuk. A permeátumot ezután megsavanyítjuk úgy, hogy pH=3,5 érték eléréséig körülbelül 40 g H_2SO_4 -ot adunk hozzá, ezután a D-



(p-hidroxi-fenil)-glicin kikristályosodik. A kristályos anyagot elválasztjuk, mossuk és szárítjuk, így 102 g D-(p-hidroxi-fenil)-glicint kapunk.

VI. Példa

A DL-(p-hidroxi-fenil)-glicin-hidantoinnak D-(-)-(p-hidroxi-fenil)-glicinné történő konverzióját különböző pH-értékeken végezzük.

34 g (177 mmól) DL-(p-hidroxi-fenil)-glicin-hidantoint és 34 g $MgHPO_4 \cdot 3H_2O$ -t adunk 200 ml vízhez. A reakcióelegy pH-ját 5n NaOH-oldattal a kívánt értékre állítjuk be, majd a reakciót 3,0 ml *Agrobacterium radiobacter* sejtuszuspenzió hozzáadásával indítjuk meg. A reakciót nitrogénatmoszférában, 40°C-on végezzük. A reakcióelegy pH-ját úgy tartjuk a kívánt értéken, hogy 5n NaOH-oldattal automatikus titrálást végzünk. A kísérletek eredményét az 1. táblázatban foglaljuk össze. Ez a táblázat azt a reakcióidőt tünteti fel, amely ahhoz szükséges, hogy 99%-nál nagyobb konverziót érjünk el.

1. Táblázat

Különböző pH értékeken mért konverziós idő a VI. példa szerinti kísérletben

pH	A 99%-nál nagyobb konverzióhoz szükséges reakcióidő (óra)
7,2	80
7,4	68
7,6	75
7,7	72
7,8	88



VII. Példa

40°C-on 30 g DL-N-karbamoil-(p-hidroxi-fenil)-glicint és 34 g $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -t adunk 200 ml vízhez. A reakcióelegy pH-ját pH=8,0 értékre állítjuk be körülbelül 15 g 42%-os KOH-oldattal. Ezután - nitrogénatmoszférában - 13 ml Agrobacterium radiobacter sejtszuszpenziót adunk az elegyhez. A reakcióelegy pH-ját állandó pH=8,0 értéken tartjuk. A reakcióelegy összetételét HPLC analízissel követjük. 27 óra reakcióidő után 4,3 tömeg% D-(p-hidroxi-fenil)-glicin és 5,4 tömeg% L-N-karbamoil-(p-hidroxi-fenil)-glicin koncentrációkat mérünk. A reakcióelegy összetétele ezután állandó marad.

VIII. Példa

15 g DL-valin-hidantoint és 20 g $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -t adunk 200 ml vízhez. A pH-t pH= 8,0 értékre állítjuk be 5n NaOH-oldat adagolásával, majd a reakciót 15 ml Agrobacterium radiobacter sejtszuszpenzió hozzáadásával indítjuk meg. A reakciót 40°C-on nitrogénatmoszférában végezzük. A reakcióelegy pH-ját állandó pH=8 értéken tartjuk 5n NaOH adagolásával. 16 órás hidrolízis után 52 g/l D-valin koncentrációt mérünk, ami 99%-nál nagyobb koverzióknak felel meg a DL-valin-hidantoinra vonatkoztatva.



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás D-enantiomerben dúsított királis aminosavak előállítására, amely eljárásban a megfelelő N-karbamoil-aminosav enantiomerjeinek elegyét érintkeztetjük D-karbamoilázzal, ammónia felszabadulása mellett, azzal jellemezve, hogy az ammóniát kétértékű fémnek foszfáttal, monohidrogén-foszfát-ionnal vagy dihidrogén-foszfát-ionnal alkotott sója alkalmazásával eltávolítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az enzimes dekarbamoilezést kétértékű fémnek foszfáttal, monohidrogén-foszfát-ionnal vagy dihidrogén-foszfát-ionnal alkotott sója jelenlétében végezzük.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a reakcióelegyet egy külső hurokban érintkeztetjük a kétértékű fémnek foszfáttal, monohidrogén-foszfát-ionnal vagy dihidrogén-foszfáttal alkotott sójával, a jelenlévő szilárd anyag elválasztása után.

4. Eljárás a D-enantiomerben dúsított királis aminosavak előállítására, amely eljárásban a megfelelő hidantoin származékot enzimes úton, hidantoináz alkalmazásával alakítjuk át a megfelelő N-karbamoil-aminosavvá, amelyet ezután átalakítunk a D-enantiomerben dúsított aminosavvá, azzal jellemezve, hogy az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárást alkalmazzuk.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, amelyben mindkét lépést olyan reakcióedényben végezzük, amelyben mind hidantoináz, mint D-karbamoiláz jelen van.

6. A 4. vagy 5. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a reakcióelegy pH-ja 7,0 és 9,0 érték között van.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kétértékű fémnek foszfáttal alkotott sójaként magnézium-monohidrogén-foszfátot használunk.



8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kapott reakcióelegy pH-ját a reakciót követően pH=9,5 és pH=10,5 közötti értékre emeljük, elválasztjuk a képződött szilárd ammónium-foszfátsót, majd az anyalúg pH-ját pH=3,5 és pH=4,5 közötti értékre csökkentjük és elválasztjuk a szilárd D-aminosavat.

9. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kapott reakcióelegy pH-ját a reakciót követően pH=0,5 és pH=1,5 közötti értékre csökkentjük, elválasztjuk a biomasszát, majd pH-t pH=3,5 és pH=4,5 közötti értékre emeljük, és a szilárd D-aminosavat elválasztjuk.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az eljárásban kapott anyalúg pH-ját ezután pH=7 és pH=10 értékek közé emeljük, és a keletkezett szilárd ammónium-foszfátsót elválasztjuk.

11. Eljárás magnézium-monohidrogén-foszfát visszanyerésére, azzal jellemezve, hogy ammónium-foszfátot ásványi savval érintkeztetünk pH=4,5 és pH=6,5 érték között, majd a magnézium-monohidrogén-foszfátot elválasztjuk az ammóniától és az ásványi savtól.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a pH-t pH=5,5 és pH=6 közötti értéken tartjuk.

13. A 11. vagy 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy ásványi savként kénsavat alkalmazunk.

2005. 10. 12.
J

A meghatalmazott
Somlai Mária
szabadalmi ügyvéd
tagja
S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvívői Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099