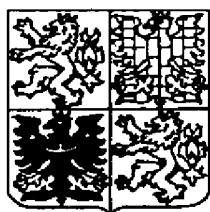


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 03.11.92
(32) 06.11.91, 06.11.91, 06.11.91
(31) 91/788640, 91/788648, 91/788683
(33) US, US, US
(40) 15.12.94

(21) 1113-94

(13) A3

5(51)

C 12 P 7/40
C 12 P 13/04
C 07 F 9/38

(71) E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY,
Wilmington, DW, US;

(72) Anton David Leroy, Wilmington, DW, US;
Dicosimo Robert, Wilmington, DW, US;
Porta Earnest William, Landenberg, PV, US;

(54) Způsob výroby N-(fosfonomethyl)glycinu

(57) Způsob výroby N-(fosfonomethyl)-glycinu, který je též znám pod označením glyfosát. Tento způsob zahrnuje hydrogenaci směsi glyoxylové kyseliny a aminomethylfosfonové kyseliny, přičemž tato směs se předem enzymaticky připraví in situ reakcí glykolové kyseliny s kyslíkem ve vodném roztoku obsahujícím aminomethylfosfonovou kyselinu a enzymy glykolát oxidasu a katalasu.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

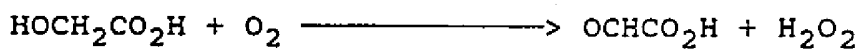
Způsob výroby N-(fosfonomethyl)glycinu

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu výroby N-(fosfonomethyl)-glycinu hydrogenací směsí vzniklých reakcí glykolové kyseliny s kyslíkem ve vodném roztoku obsahujícím aminomethylfosfonovou kyselinu (AMPA) a enzymy glykolát oxidasu [(S)-2-hydroxykyselina oxidasu, EC 1.1.3.15] a katalasu (EC 1.11.1.6). N-(fosfonomethyl)glycin je postemergentní fytotoxická látka a herbicid se širokým spektrem účinnosti, užitečný při regulaci růstu širokého rozsahu rostlin.

Dosavadní stav techniky

Glykolát oxidasa je enzym, který se běžně nalézá v buňkách listů zelených rostlin a savčích buňkách a který katalyzuje oxidaci glykolové kyseliny na glyoxylovou kyselinu za současné tvorby peroxidu vodíku. Tuto reakci lze popsat následující chemickou rovnicí:



N. E. Tolbert et al., (J. Biol. Chem., sv. 181, str. 905 - 914 (1949)) poprvé oznámili objev enzymu extrahovaného z listů tabáku, který katalyzuje oxidaci glykolové kyseliny na kyselinu mravenčí a oxid uhličitý přes tvorbu meziprojektu, kterým je glyoxylová kyselina. Přídavkem určitých sloučenin, jako je ethylendiamin bylo možno omezit další oxidaci intermediární glyoxylové kyseliny. Podle této citace se oxidace provádějí při pH přibližně 8, obvykle za použití kyseliny glykolové v koncentraci přibližně 3 až 40mM (mmol/l). Optimální hodnota pH pro oxidaci glykolátu je údaje 8,9. Bylo oznámeno, že

kyselina šťavelová (v 100mM koncentraci) inhibuje katalytické působení glykolát oxidasy. Podobně, K. E. Richardson a N. E. Tolbert, J. Biol. Chem., sv. 236. str. 1280 - 1284 (1961) ukázali, že pufrý obsahující tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) inhibují tvorbu kyseliny šťavelové při oxidaci glykolové kyseliny, která je katalýzována glykolát oxidasou. C. O. Clagett, N. E. Tolbert a R. H. Burris (J. Biol. Chem., sv. 178, str. 977 - 987 (1949)) oznámili, že optimální hodnota pH pro oxidaci glykolové kyseliny kyslíkem, která je katalýzována glykolát oxidasou, je přibližně 7,8 - 8,6 a optimální teplota leží v rozmezí od 35 do 40 °C.

I. Zelitch a S. Ochoa [J. Biol. Chem., sv. 201, str. 707 - 718 (1953)] a J. C. Robinson et al., [J. Biol. Chem., sv. 237, str. 2001 - 2009 (1962)] oznámili, že tvorba kyseliny mravenčí a oxidu uhličitého při oxidaci glykolové kyseliny působením glykolát oxidasy ze špenátu je důsledkem neenzymatické reakce peroxidu vodíku s glyoxylovou kyselinou. Tito autoři zjistili, že přidavkem katalasy, což je enzym, který katalýzuje rozklad peroxidu vodíku, je možno podstatně zlepšit výtěžky glyoxylové kyseliny tím, že se potlačí tvorba kyseliny mravenčí a oxidu uhličitého. Také bylo zjištěno, že lze podstatně zvýšit stabilitu glykolát oxidasy přidavkem FMN (flavinmononukleotidu).

N. A. Frigerio a H. A. Harbury [J. Biol. Chem., sv. 231, str. 135 - 157 (1958)] oznámili přípravu a vlastnosti glykolová kyselina oxidasy, izolované ze špenátu. Bylo zjištěno, že tento purifikovaný enzym je velmi nestálý v roztoku. Tato nestálost byla vysvětlována poměrně slabou vazbou flavinmononukleotidu (FMN) k účinnému místu enzymu a disociací enzymaticky účinných tetramerů a/nebo oktamerů enzymu na enzymaticky neúčinné monomery a dimery, které se nevratně agregují a srážejí. Přidavkem FMN (flavinmononukle-

otidu) k roztokům tohoto enzymu bylo možno dosáhnout podstatného zvýšení stability enzymu. Vysoké koncentrace proteinu nebo vysoká iontová síla jsou schopny enzym udržet ve formě oktamerů nebo tetramerů.

Existují četné další odkazy, které se vztahují k oxidaci glykolové kyseliny, která je katalyzována glykolová kyselina oxidasou. Izolace enzymu (a zkušební metoda) jsou popsány v následujících odkazech: I. Zelitch, *Methods in Enzymology*, sv. 1, Academic Press New York, 1955, str. 528 - 532 (enzym ze špenátových a tabákových listů); M. Nishimura et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, sv. 222, str. 397 - 402 (1983) (z kotyledonů tykve); H. Asker a D. Davies, *Biochem. Biophys. Acta*, sv. 761, str. 103 - 108 (1983) (z jater krysy); a M. J. Emes a K. H. Erismann, *Int. J. Biochem.*, sv. 16, str. 1373 - 1378 (1984) (z *Lemma minor* L.). Strukturu tohoto enzymu rovněž oznámili E. Cederlund et al., [*Eur. J. Biochem.*, sv. 173, str. 523 - 530 (1988) a Y. Lindquist a C. Branden, *J. Biol. Chem.*, sv. 264, str. 3624 - 3628 (1989)].

Jsou známy četné metody pro přípravu N-(fosfonomethyl)glycinu z aminomethylfosfonové kyseliny a glyoxylové kyseliny. Jedna taková metoda, která je popsána v Rogers et al., *Evropská patentová přihláška č. 186 648*, zahrnuje kondenzaci glyoxylové kyseliny nebo její soli s aminomethylfosfonovou kyselinou nebo její solí, za vzniku meziprojektu, který je obvykle považován za aldimin (Schiffovu bázi), který se bez izolace redukuje, například katalytickou hydrogenací, na N-(fosfonomethyl)glycin. Při druhé z těchto metod (Gaertner, *US patent 4 094 928*) se stejný meziprodukt, karbonylaldiminomethanfosfonát, připravuje reakcí esteru kyseliny glyoxylové s esterem aminomethylfosfonové kyseliny v nevodném rozpouštědle. Po azeotropickém oddestilování vody a odstranění rozpouštědla se izolovaný ester karbonylaldiminomethanfosfonové kyseliny

redukuje a esterové skupiny se hydrolýzují, za vzniku N-(fosfonomethyl)glycinu.

Výše uvedené postupy, které vedou k N-(fosfonomethyl)glycinu, mají nevýhodu v tom, že glyoxylová kyselina je velmi nákladná výchozí látka, a proto je snaha získat požadovanou látku méně nákladnými způsoby. Existující způsoby přípravy glyoxylové kyseliny, jako je hydrolýza dihalogenoctové kyseliny, elektrolytická redukce kyseliny šťavelové, oxidace glyoxalu, katalytická oxidace ethylenu nebo acetaldehydu a ozonolýza kyseliny maleinové, jejích esterů nebo jejího anhydridu, jsou v praxi doprovázeny jedním nebo více problémy, jako jsou například nákladné stupně separace a čištění, nízké výtěžky nebo velké množství odpadních produktů. Způsob popsáný Gaertnerem je též nevýhodný z toho důvodu, že vyžaduje několik přídavných stupňů (které jsou spojeny s odpovídajícím poklesem výtěžku) a nežádoucí izolací meziprojektu.

Další způsob syntézy N-(fosfonomethyl)glycinu, který je popsán v US patentu č. 4 670 191 (Kleiner) zahrnuje reakci aminomethylfosfonové kyseliny nebo její soli přibližně s dvěma molárními ekvivalenty glyoxylové kyseliny ve vodném prostředí. Nadbytek glyoxylové kyseliny zřejmě působí jako redukční činidlo, které převádí intermediární reakční produkt kyseliny glyoxylové a kyseliny aminomethylfosfonové na požadovaný N-(fosfonomethyl)glycin a sám o sobě se oxiduje na jeden nebo více vedlejších produktů, včetně oxidu uhličitého. Podobně, Fields et al., (US patent č. 4 851 159) připravují N-(fosfonomethyl)glycin zahříváním N-acylaminoethylfosfonové kyseliny s glyoxylovou kyselinou nebo jejím derivátem. Molární poměr glyoxylové reakční složky k N-acylamino složce je přednostně v rozmezí od 2 do 1. Při nižších molárních poměrech se dosahuje snížených výtěžků.

Postupy podle Kleinerera a Fieldse et al. mají nevýhodu nejen v tom, že se při nich používá poměrně nákladné glyoxylové kyseliny, nýbrž i v tom, že se tato kyselina také obětuje jako redukční činidlo (tj. na každý mol vyrobeného N-(fosfonomethyl)glycinu se používá přibližně jednoho mol glyoxylátu jako redukčního činidla) a jako kondenzační činidlo pro amino(nebo N-acylamino)methylfosfonovou kyselinu.

Podstata vynálezu

Způsob výroby N-(fosfonomethyl)glycinu podle tohoto vynálezu zahrnuje hydrogenaci směsi, kterážto směs byla enzymaticky vyrobena reakcí glykolové kyseliny s kyslíkem ve vodném roztoku obsahujícím aminomethylfosfonovou kyselinu (AMPA) a enzymy glykolát oxidasu a katalasu. V souvislosti s vynálezem je třeba si uvědomit, že směsi vyrobené enzymatickou oxidací glykolové kyseliny za přítomnosti aminomethylfosfonové kyseliny nutně obsahují kromě požadované složky glyoxylové kyseliny také různé vedlejší produkty oxidace (jako jejich neomezující příklady je možno uvést šťavelany, mravenčany a oxid uhličitý). V těchto směsích budou také přítomny nezreagovaný glykolát, jakož i různé přísady, jako je flavinmononukleotid (dále označovaný zkratkou FMN) apod. z nichž všechny mohou popřípadě ovlivňovat požadovanou následnou hydrogenační reakci. Tak například se zjistilo (na toto zjištění se vynález neomezuje), že jak formiát tak FMN snižují dosaženou uhlíkovou bilanci, pokud jsou přítomny v průběhu hydrogenace glyoxylové kyseliny, prováděné za přítomnosti AMPA. Předmětem tohoto vynálezu je proto dále i způsob odstraňování a regenerace enzymů z roztoku vzniklého při enzymatické oxidaci a případný způsob odstraňování FMN před hydrogenačním stupněm.

Předmětem vynálezu je tedy zlepšený způsob výroby N-(fosfonomethyl)glycinu, který zahrnuje stupeň redukce směsi glyoxylové kyseliny a aminomethylfosfonové kyseliny hydrogenací, přičemž výše uvedená směs se enzymaticky vyrobí in situ ve vodném roztoku tak, že se do vodného roztoku glykolové kyseliny zavede první katalyzátor, který je schopen katalyzovat oxidaci glykolové kyseliny kyslíkem na glyoxylovou kyselinu a peroxid vodíku a druhý katalyzátor, který je schopen katalyzovat rozklad peroxidu vodíku, hodnota pH tohoto roztoku se nastaví do rozmezí od 6 do asi 10, roztok se uvede do styku se zdrojem kyslíku při účinné teplotě a po dobu postačující pro konverzi přinejmenším části složky glykolové kyseliny na složku glyoxylové kyseliny, za přítomnosti aminomethylfosfonové kyseliny a styk tohoto roztoku s kyslíkem se přeruší před redukčním stupněm.

Přednostně se používá enzymatických katalyzátorů a zvláště výhodné je, když prvním enzymem je glykolát oxidasa [(S)-2-hydroxykyselina oxidasa, EC 1.1.3.15] a druhým enzymem je katalasa (EC 1.11.1.6). Když se skončí kontaktování roztoku s kyslíkem za přítomnosti katalyzátorů/enzymů, katalyzátory/enzymy se odstraní, jako například filstrací nebo centrifugací a potom se roztok vystaví redukčním podmínkám za účelem výroby N-(fosfonomethyl)glycinu.

Díky tomu, že způsob podle vynálezu umožňuje vyhnout se přípravě glyoxylové kyseliny ve zvláštním stupni, představuje účinnější a ekonomičtější způsob výroby N-(fosfonomethyl)glycinu.

Předmětem vynálezu je tedy zlepšený způsob výroby N-(fosfonomethyl)glycinu redukcí směsi glyoxylové kyseliny a aminomethylfosfonové kyseliny, který se vyhýbá nutnosti odděleně připravovat glyoxylovou kyselinu.

Předmět vynálezu také představuje způsob, při němž se glyoxylová kyselina enzymaticky tvoří in situ za přítomnosti aminomethylfosfonové kyseliny ze snadno dostupného prekursoru, totiž glykolové kyseliny, což se v konečném důsledku projevuje tím, že je k dispozici účinnější a hospodárnější způsob výroby N-(fosfonomethyl)glycinu.

Následuje podrobnější popis vynálezu.

Zlepšený způsob výroby N-(fosfonomethyl)glycinu podle tohoto vynálezu zahrnuje redukci směsi obsahující glyoxylovou kyselinu (nebo její vhodný derivát) s aminomethylfosfonovou kyselinou (AMPA) (nebo jejím vhodným derivátem). Přednostně se tato směs připravuje katalytickou oxidací složky glykolové kyseliny nebo její vhodné soli tak, že se složka glykolové kyseliny uvede do styku se zdrojem molekulárního kyslíku za přítomnosti AMPA a katalyzátoru, který účinně katalyzuje reakci glykolové kyseliny s kyslíkem, za vzniku glyoxylové kyseliny. Jedním takovým katalyzátorem je přírodní enzym glykolát oxidasa (EC 1.1.3.15), také známý pod názvem glykolová kyselina oxidasa, který je schopen katalyzovat reakci vedoucí ke vzniku glyoxylové kyseliny ve vysokých výtěžcích při vysoké konverzi glykolové kyseliny ve vodných prostředích za mírných podmínek pH a teploty, tj.



Katalytická oxidace glykolové kyseliny nebo její vhodné soli se účelně provádí tak, že se glykolová kyselina uvádí do styku se zdrojem molekulárního kyslíku za přítomnosti enzymatického katalyzátoru, který katalyzuje reakci glykolové kyseliny s kyslíkem za vzniku glyoxylové kyseliny. Jedním takovým katalyzátorem je enzym glykolát oxidasa (EC 1.1.3.15), který je též znám pod označením

kyselina glykolová oxidasa. Glykolát oxidasa se může izolovat z četných zdrojů, které jsou v tomto oboru dobře známy. Glykolát oxidasa, které se při reakci používá, by měla být přítomna v účinné koncentraci, obvykle koncentraci od asi 0,01 do asi 1000 IU/ml, přednostně od asi 0,1 do asi 4 IU/ml. Jednotka "IU" (International Unit) je definována jako množství enzymu katalyzující transformaci 1 μ mol substrátu za minutu. Způsob stanovení tohoto enzymu je popsán v I. Zelitch a S. Ochoa [J. Biol. Chem., sv. 201, str. 707 - 718 (1953)]. Této metody se také používá pro stanovení aktivity regenerované nebo recyklované glykolát oxidasy.

Přestože je enzymaticky katalyzovaná reakce glykolové kyseliny s kyslíkem dobře známa, až dosud nebylo dosaženo vysoké selektivity na glyoxylovou kyselinu a nejsou k dispozici žádné zprávy o tom, že by enzymatická oxidace glykolové kyseliny byla prováděna za přítomnosti aminomethylfosfonové kyseliny (AMPA). Dřívější patentová přihláška, tj. mezinárodní přihláška PCT s publikačním číslem WO 91/05868, z 2. května 1991 o názvu "Production of Glyoxylic Acid by Enzymatic Oxidation of Glycolic Acid" popisuje způsob enzymatické konverze glykolové kyseliny na glyoxylovou kyselinu za přítomnosti kyslíku, aminového pufru a rozpustného enzymu glykolát oxidasy a katalasy. Při tomto způsobu byl demonstrován neočekávaný synergický účinek vyplývající z použití katalasy (za účelem rozložení peroxidu vodíku, který vzniká jako vedlejší produkt) a aminového pufru, který umožňuje získat chemický adukt s vyrobenou glyoxylovou kyselinou (což omezuje další oxidaci této látky). Ani přidání samotné katalasy ani přidání samotného aminového pufru nemá za následek dosažení vysoké selektivity, která je pozorována, když jsou najednou přítomny obě tyto látky a téměř kvantitativní výtěžek glyoxylové kyseliny, kterého se při reakci dosahuje je

vyšší, než je výtěžek, který mohl být očekáván na základě součtu účinků katalasy a aminového pufru, pokud se těchto látek používá jednotlivě.

Zjistilo se, že zlepšení výtěžků glyoxylátu, kterého se dosahuje tím, že se vytvoří komplex glyoxylátu a aminového pufru, který je odolný vůči oxidaci (přes tvorbu N-substituovaného hemiaminalu a/nebo iminu), je závislé na hodnotě pKa protonovaného aminového pufru. Výsledek oxidace vodného roztoku glykolové kyseliny (ve formě 0,25M roztoku) za přítomnosti aminového pufru (0,33M, pH 8,3), glykolát oxidasy (0,5 IU/ml), katalasy (1400 IU/ml) a FMN (0,01mM) při 30 °C a za tlaku kyslíku 0,1 MPa za dobu 24 hodin je uveden v následující tabulce, současně s výsledky reakcí, které byly prováděny za použití dvou pufrů, u nichž nelze očekávat, že by mohly vytvářet komplex s glyoxylátem (fosfátový a bicinový pufr):

Pufr (pKa)	Oxalát (%)	Glyoxylát (%)	Glykolát (%)	Formiát (%)
ethyldiamin (6,85; 9,93)	6,8	85,5	0,8	2,4
TRIS (8,08)	1,1	81,0	2,8	12,0
methylenamin (10,62)	1,0	53,9	39,8	5,1
ethanolamin (9,50)	1,8	69,6	4,81	24,5
chlorid amonný (9,24)	1,1	39,9	37,7	18,9
isopropanolamin (9,43)	2,0	60,0	4,8	37,4
bicin (8,30)	1,0	24,9	25,6	43,8
fosfát (2,15; 7,10; 12,3)	0,7	24,5	52,4	21,2

Ze zkoušených aminových pufrů se s aminy, jejichž hodnota pK_a je přibližně rovna pH reakční směsi nebo nižší (tj. ethylendiaminem a TRIS) dosahuje podstatně vyšších výtěžků glyoxylátu (a nižší tvorby formiátu a oxalátu) ve srovnání s aminovými pufrů, jejichž hodnoty pK_a jsou vyšší, než je hodnota pH , při níž byla reakce prováděna. Tyto výsledky jsou konsistentní s očekáváním, že přítomnost neprotonovaného aminu představuje nutnou podmínku pro tvorbu oxidačně stálého N-substituovaného hemiaminalového a/nebo iminového komplexu s glyoxylátem. Aminový pufr, jehož hodnota pK_a je podstatně vyšší než pH reakční směsi, by byl v reakční směsi přítomen převážně ve formě protonovaného amoniového iontu, a proto by byla menší pravděpodobnost vzniku takových komplexů s glyoxylátem.

Hodnota pK_a protonovaného aminu odvozeného od aminomethylfosfonové kyseliny (AMPA) je údajně 10,8 (Lange's Handbook of Chemistry, J. A. Dean, Ed., McGraw-Hill, New York, 1979, 12. vydání) a proto nebylo možno očekávat, že přidávkou AMPA při enzymatické oxidaci glykolové kyseliny při pH v rozmezí od 7 do 9 by se mohlo projevit zvýšením výtěžků glyoxylové kyseliny. Připojené příklady ilustrují, že za použití tohoto aminu je možno dosáhnout výtěžků kyseliny glyoxylové až 92 %. Kromě neočekávaných vysokých výtěžků glyoxylové kyseliny se použití AMPA také projevuje ve zlepšené regeneraci aktivity glykolát oxidasy a katalasy, ve srovnání s reakcemi, které se provádějí za nepřítomnosti přidané AMPA (příklad 13). Při postupech, při nichž se používá enzymových katalyzátorů bývá regenerace katalyzátoru pro recyklování obvykle nutná, poněvadž náklady na katalyzátor tvoří podstatnou složku celkových výrobních nákladů.

Optimálních výsledků při použití glykolát oxidasy jako katalyzátoru oxidační konverze glykolové kyseliny na

glyoxylovou kyselinu se získají v tom případě, že se do reakčního roztoku přidá katalyzátor rozkladu peroxidu vodíku. Jedním takovým katalyzátorem, který způsobuje rozklad peroxidu a který je účinný v kombinaci s glykolát oxidasou, je enzym katalasa (E.C.1.11.1.6). Katalasa katalyzuje rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík a předpokládá se, že příčinou zlepšení výtěžků glyoxylové kyseliny při způsobu podle vynálezu, poněvadž urychluje rozklad peroxidu vodíku vznikajícího spolu s glyoxylovou kyselinou při glykolát oxidasou katalyzované reakci glykolové kyseliny s kyslíkem. Koncentrace katalasy by měla být v rozmezí od 50 do 50000 IU/ml, přednostně 500 až 15000 IU/ml. Koncentrace katalasy a glykolát oxidasy se přednostně nastavuje do výše uvedených rozmezí tak, aby poměr (uváděný pro každý enzym v IU) katalasy ke glykolát oxidase byl přinejmenším asi 250:1.

Další případnou, ale často prospěšnou přísadou k reakčnímu roztoku je flavinmononukleotid (FMN), kterého se obvykle používá v koncentraci od 0,0 do asi 2,0mM, přednostně asi 0,01 až asi 0,2mM. Předpokládá se, že FMN zvyšuje produktivitu glykolát oxidasy, čímž je míněno množství glykolové kyseliny převedené na glyoxylovou kyselinu, vztažené na jednotku enzymu. Uváděná koncentrace přidaného FMN představuje přídavnou koncentraci FMN k množství FMN, které je popřípadě do reakčního systému zavedeno spolu s enzymem (FMN se totiž často přidává k enzymu v průběhu jeho přípravy). Struktura FMN a způsob jeho analýzy jsou popsány v K. Yagai, Methods of Biochemical Analysis, sv. X, Interscience Publishers, New York, 1962, str. 319 - 355.

Glykolová kyselina (kyselina 2-hydroxyoctová) je obchodně dostupná. Při reakci podle vynálezu leží její počáteční koncentrace v rozmezí od 0,10 do 2,0, přednostně

od 0,25 do 1,0M. Může se jí používat jako takové nebo ve formě kompatibilní soli, tj. soli, která je rozpustná ve vodě a jejíž kation nenarušuje požadovanou konverzi glykolové kyseliny na glyoxylovou kyselinu nebo následující reakci získané glyoxylové kyseliny s aminomethylfosfonovou kyselinou, kterou se připravuje N-(fosfonomethyl)glycin. Vhodná kompatibilní solitvorná kationtová skupina se snadno může zjistit pokusně. Jako reprezentativní příklady vhodných solí je možno uvést soli alkalických kovů, kovů alkalických zemin, amonné soli, substituované amoniové soli, fosfoniové soli a substituované fosfoniové soli.

Konverze glykolové kyseliny na glyoxylovou kyselinu se účelně a přednostně provádí ve vodných prostředích. Do tohoto vodného prostředí se přidává aminomethylfosfonová kyselina (AMPA) nebo její vhodná sůl až do dosažení molárního poměru AMPA/glykolová kyselina (výchozí množství) v rozmezí od 0,01/1,0 do 3,0/1,0, přednostně od 0,25/1,0 do 1,05/1,0. Po smísení AMPA s glykolovou kyselinou ve vodném roztoku se hodnota pH výsledné směsi nastaví na 6 až 10, přednostně 7,0 až 9,0. V tomto rozmezí pH se může přesná hodnota pH nastavit na požadovanou hodnotu přidávkem jakékoliv kompatibilní neinterferující báze, jako je hydroxid uhličitý, hydrogenuhličitý a fosforečnan alkalického kovu. V průběhu reakce hodnota pH reakční směsi poněkud klesá, takže je často užitečné zahajovat reakci v blízkosti horní meze rozmezí pH, v němž má enzym maximální aktivitu, tj. při asi 9,0 až 8,5, aby mohla hodnota pH v průběhu reakce poklesnout. Hodnota pH se popřípadě také může udržovat separátním přidáváním neinterferujícího anorganického nebo organického pufru, poněvadž aktivita enzymu se mění s pH.

Je známo, že glykolová kyselina a glyoxylová kyselina je vysoce disociována ve vodě a při pH v rozmezí od

6 do 10 je převážně, pokud ne úplně, přítomna ve formě glykolátových či glyoxylátových iontů. Odborníkům v tomto oboru je také zřejmé, že glyoxylová kyselina (a konjugovaná báze, glyoxylátový anion) může být též přítomna v hydratované formě, například ve formě sloučeniny vzorce $(\text{HO})_2\text{CHCOOH}$ a/nebo ve formě hemiacetalu vzorce $\text{HOOCCH}(\text{OH})\text{OCH}(\text{OH})\text{COOH}$, kteréžto sloučeniny a jejich aniontové varianty jsou ekvivalentní glyoxylové kyselině a jejímu aniontu v tom smyslu, že jsou vhodnými reakčními složkami pro tvorbu N-(fosfonomethyl)glycinu.

Kyslík (O_2), tj. oxidační činidlo pro konverzi glykolové kyseliny na glyoxylovou kyselinu, se může k reakční směsi přidávat v plynné formě tak, že se kapalná fáze míchá na fázovém rozhraní plyn-kapalina nebo se může zavádět prostřednictvím membrány propustné pro kyslík. Předpokládá se, že za většiny podmínek je reakční rychlost přinejmenším z části kontrolována rychlostí, kterou se kyslík rozpouští ve vodném prostředí. Přestože se tedy může kyslík přidávat do reakční směsi ve formě vzduchu, přednostně se používá kyslíku v poměrně čisté formě a dokonce se pracuje za zvýšených tlaků. Ačkoliv neexistuje žádná horní hranice tlaku kyslíku, může se používat tlaku kyslíku až do 5 MPa a přednostní horní hranice tlaku kyslíku je 1,5 MPa. Míchání je důležité pro zajištění vysokého stupně rozpouštění kyslíku a tedy vysoké reakční rychlosti. Může se použít jakékoliv vhodné formy míchání, jako například míchání rotačním míchadlem. Na druhé straně, jak je dobře známo odborníkům v oboru enzymů, mohou vysoké střižné síly při míchání nebo míchání s vysokou tvorbou pěny mít za následek snížení aktivity enzymu nebo enzymů a je zapotřebí se mu vyhnout.

Reakční teplota je důležitou proměnnou, poněvadž ovlivňuje reakční rychlost a stabilitu enzymů. Může se

pracovat při reakční teplotě od 0 do 40 °C, ale přednostní rozmezí reakční teploty je 5 až 15 °C. Jestliže se pracuje v přednostním teplotním rozmezí, maximalizuje se regenerovaná aktivita enzymu na konci reakce. Teplota by neměla být tak nízká, aby vodný roztok začal mrznout. Teplotu lze regulovat běžnými metodami jako například tím, že se pracuje v duplikátorové reakční nádobě a duplikátorovým pláštěm se vede teplosměnná kapalina o vhodné teplotě. Reakční nádoba může být zhotovena z jakéhokoliv materiálu, který je inertní vůči reakčním složkám.

Po skončení reakce se mohou enzymy oddělit filtrací nebo odstřeďováním a mohou se recirkulovat. Alternativně se mohou denaturovat a vysrážet zahřátím, například pětiminutovým zahříváním na 70 °C a/nebo se mohou ponechat v reakční směsi, pokud jejich přítomnost při následujících stupních konverze směsi glyoxylové kyseliny a aminomethylfosfonové kyseliny na N-(fosfonomethyl)glycin a izolace N-(fosfonomethyl)glycinu z reakční směsi není na závažu.

Po ukončení kontaktu reakčního roztoku s kyslíkem a přednostně po odstranění enzymu glykolát oxidasy a enzymu katalasy, pokud jsou tyto enzymy přítomny, se může popřípadě odstranit z reakční směsi flavinmononukleotid (FMN) tím, že se roztok uvede do styku s aktivním uhlím. Roztok obsahující glyoxylovou kyselinu a aminomethylfosfonovou kyselinu (o nichž se předpokládá, že jsou v rovnováze s odpovídajícím iminem) se redukuje, za vzniku N-(fosfonomethyl)glycinu.

Katalytická hydrogenace představuje přednostní metodu pro přípravu N-(fosfonomethyl)glycinu ze směsi glyoxylové kyseliny a aminomethylfosfonové kyseliny. Katalyzátory, které jsou vhodné pro tento účel zahrnují (uvedený výčet není omezující) různé kovy ze skupiny platiny, jako je iridium, osmium, rhodium, ruthenium,

platina a paladium a také různé jiné přechodové kovy, jako je kobalt, měď, nikl a zinek. Katalyzátor může být čistý (tj. bez nosiče), například Raneyův nikl nebo oxid platiny nebo může být nanesen na nosiči, jako například platina na uhlíku, paladium na oxidu hlinitém nebo nikl na křemelině. Přednost se dává paladiu na uhlíku, niklu na křemelině a Raneyovu niklu.

Hydrogenace se může provádět při pH v rozmezí od 4 do 11, přednostně od 5 do 10. V tomto rozmezí pH se může přesná hodnota nastavovat na požadovanou hodnotu přidávkem jakékoliv kompatibilní neinterferující báze nebo kyseliny. Jako neomezující příklady vhodnýchází je možno uvést hydroxidy, uhličitany, hydrogenuhličitany a fosforečnany alkalických kovů a jako neomezující příklady vhodných kyselin je možno uvést kyselinu chlorovodíkovou, kyselinu sírovou nebo kyselinu fosforečnou.

Hydrogenační teplota a tlak mohou kolísat v širokých mezích. Teplota může být obecně v rozmezí od 0 do 150, přednostně od 20 do 90 °C, zatímco tlak vodíku leží obvykle v rozmezí přibližně od tlaku atmosferického do asi 10 MPa, přednostně od 0,1 do 1,0 MPa. Hydrogenačního katalyzátoru se používá v minimální koncentraci, která postačuje pro dosažení požadované reakční rychlosti a úplné konverze výchozích látek za zvolených reakčních podmínek. Tato koncentrace se snadno určí pokusem. Katalyzátoru se může používat v množství od 0,001 do 20 nebo více dílů hmotnostních na 100 dílů hmotnostních směsi glyoxylové kyseliny a AMPA, použité při reakci.

N-(fosfonomethyl)glycin, což je látka důležitá jako postemergentní herbicid, se může izolovat z redukčního roztoku, ať již se použije jakéhokoliv způsobu redukce, libovolným způsobem izolace známým v tomto oboru, jako jsou

například způsoby popsané v US patentech č. 4 851 159 a 4 670 191 a Evropských patentových přihláškách č. 186 648 a 413 672.

V následujících příkladech, které mají za úkol dále objasnit vynález, aniž by jej omezovaly, jsou výtěžky glyoxylátu, formiátu a oxalátu a regenerovaného glykolátu uváděny v procentech, vztažených na celkové množství glykolové kyseliny přítomné na počátku reakce. Analýzy reakční směsi se provádějí za použití vysokotlaké kapalinové chromatografie. Analýzy organických kyselin se provádějí za použití sloupce Bio-Rad HPX-87H a AMPA a N-(fosfonomethyl)-glycin se analyzují za použití analytického sloupce Bio-Rad Aminex glyphosate. Uváděné výtěžky N-(fosfonomethyl)glycinu jsou vztaženy buď na glyoxylát nebo AMPA, v závislosti na tom, která reakční složka je při reakci omezující.

Příklady provedení vynálezu

P ř í k l a d . 1

Do 85ml Fischer-Porterovy skleněné aerosolové reakční nádoby se umístí magnetická míchací tyčinka a 10 ml vodného roztoku obsahujícího glykolovou kyselinu (0,25M), aminomethylfosfonovou kyselinu (AMPA, 0,263M), FMN (0,01mM), kyselinu propionovou (vnitřní standard pro HPLC, 0,125M), glykolát oxidasu (ze špenátu, 1,0 IU/ml) a katalasu (z *Aspergillus niger*, 1400 IU/ml) při pH 8,5. Reakční nádoba se uzavře, směs uvnitř se ochladí na 15 °C a potom se nádoba propláchne kyslíkem tím, že se uvede kyslík až do tlaku 481 kPa a potom se tlak uvolní na tlak atmosférický, přičemž tento postup se provádí za míchání a opakuje se 5x. Potom se do nádoby uvede znovu kyslík až do tlaku 481 kPa a směs se

míchá při 15 °C. Vzorkovacím otvorem se z nádoby injekční stříkačkou odebírají alikvotní vzorky (0,10 ml) (bez poklesu tlaku v nádobě) v pravidelných intervalech a tyto vzorky se analyzují HPLC, za účelem sledování postupu reakce. Po 5 hodinách reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 70,4 %, formiátu 19,6 % a oxalátu 2,2 % a obsah zbývajícího glykolátu 5,3 %. Zbytková aktivita glykolát oxidasy je 27 % a katalasy 100 % jejich původní hodnoty.

P ř í k l a d 2
(srovnávací)

Opakuje se reakce popsaná v příkladu 1 za použití 0,33M hydrogenfosforečnanu didraselného místo 0,265M AMPA. Po 5 hodinách reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 34,1 %, formiátu 11,1 % a oxalátu 0,2 % a obsah zbývajícího glykolátu 58,7 %. Po 23 hodinách reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 39,4 %, formiátu 44,7 % a oxalátu 15,34 %, přičemž obsah zbývajícího glykolátu je nulový. Zbytková aktivita glykolát oxidasy je 85 % a katalasy 87 % jejich původní hodnoty.

P ř í k l a d 3
(srovnávací)

Opakuje se reakce popsaná v příkladu 1 za použití 0,263M bicinového pufru místo 0,265M AMPA. Po 5 hodinách reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 42,5 %, formiátu 49,6 % a oxalátu 10,1 % a obsah zbývajícího glykolátu 0,2 %. Zbytková aktivita glykolát oxidasy je 47 % a katalasy 100 % jejich původní hodnoty.

P ř í k l a d 4

Opakuje se reakce popsaná v příkladu 1 za použití 5600 IU/ml katalasy z *Aspergillus niger*. Po 6 hodinách reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 85,5 %, formiátu 7,6 % a oxalátu 3,3 % a obsah zbývajícího glykolátu 2,5 %. Zbytková aktivita glykolát oxidasy je 36 % a katalasy 100 % jejich původní hodnoty.

P ř í k l a d 5

Opakuje se reakce popsaná v příkladu 1 za použití 14000 IU/ml katalasy z *Aspergillus niger*. Po 6 hodinách reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 88,0 %, formiátu 3,3 % a oxalátu 3,0 % a obsah zbývajícího glykolátu 3,4 %. Zbytková aktivita glykolát oxidasy je 28 % a katalasy 96 % jejich původní hodnoty.

P ř í k l a d 6

Opakuje se reakce popsaná v příkladu 1 za použití 56000 IU/ml katalasy z *Aspergillus niger*. Po 6 hodinách reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 84,0 %, formiátu 0,4 % a oxalátu 2,5 % a obsah zbývajícího glykolátu 8,4 %. Zbytková aktivita glykolát oxidasy je 16 % a katalasy 76 % jejich původní hodnoty.

P ř í k l a d 7

Do 85ml Fischer-Porterovy skleněné aerosolové reakční nádoby se umístí magnetická míchací tyčinka a 10 ml vodného roztoku obsahujícího glykolovou kyselinu (0,25M), aminomethylfosfonovou kyselinu (AMPA, 0,20M), FMN (0,01mM), kyselinu máselnou (vnitřní standard pro HPLC, 0,10M), glykolát oxidasu (ze špenátu, 1,0 IU/ml) a katalasu (z *Aspergillus niger*, 14000 IU/ml) při pH 8,5. Reakční nádoba se uzavře, směs uvnitř se ochladí na 5 °C a potom se nádoba propláchne kyslíkem tím, že se uvede kyslík až do tlaku 481 kPa a potom se tlak uvolní na tlak atmosférický, přičemž tento postup se provádí za míchání a opakuje se 5x. Potom se do nádoby uvede znovu kyslík až do tlaku 481 kPa a směs se míchá při 5 °C. Vzorkovacím otvorem se z nádoby injekční stříkačkou odebírají alikvotní vzorky (0,10 ml) (bez poklesu tlaku v nádobě) v pravidelných intervalech a tyto vzorky se analyzují HPLC, za účelem sledování postupu reakce. Po 6 hodinách reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 92,3 %, formiátu 4,36 % a oxalátu 5,5 %, přičemž obsah zbývajících glykolátu je nulový. Zbytková aktivita glykolát oxidasy je 87 % a katalasy 88 % jejich původní hodnoty. Koncová hodnota pH reakční směsi je 6,7.

Výsledná směs glyoxylové kyseliny (0,23M) a AMPA (0,20M) se přefiltruje v koncentračním zařízení Amicon Centriprep 10 (vylučovací mez molekulové hmotnosti 10000), aby se odstranily rozpustné enzymy a potom se filtrát umístí do 85ml Fischer-Porterovy láhve vybavené magnetickou míchací tyčinkou. Do této láhve se přidá 0,100 g 10% paladia na uhlíku, láhev se uzavře, propláchne dusíkem a potom se do ní uvede vodík do tlaku 343 kPa, načež se vzniklá směs míchá při 25 °C. Koncentrace N-(fosfonomethyl)glycinu (stanovená HPLC) je po 17 hodinách reakce 0,13M (66% výtěžek, vztaženo na AMPA).

P ř í k l a d 8

Do 85ml Fischer-Porterovy skleněné aerosolové reakční nádoby se umístí magnetická míchací tyčinka a 10 ml vodného roztoku obsahujícího glykolovou kyselinu (0,50M), aminomethylfosfonovou kyselinu (AMPA, 0,40M), FMN (0,01mM), kyselinu máselnou (vnitřní standard pro HPLC, 0,10M), glykolát oxidasu (ze špenátu, 1,0 IU/ml) a katalasu (z *Aspergillus niger*, 14000 IU/ml) při pH 8,5. Reakční nádoba se uzavře, směs uvnitř se ochladí na 5 °C (místo na 15 °C, jak to bylo uvedeno v některých z předchozích příkladů) a potom se nádoba propláchne kyslíkem tím, že se uvede kyslík až do tlaku 481 kPa a potom se tlak uvolní na tlak atmosférický, přičemž tento postup se provádí za míchání a opakuje se 5x. Potom se do nádoby uvede znovu kyslík až do tlaku 481 kPa a směs se míchá při 5 °C. Vzorkovacím otvorem se z nádoby injekční stříkačkou odebírají alikvotní vzorky (0,10 ml) (bez poklesu tlaku v nádobě) v pravidelných intervalech a tyto vzorky se analyzují HPLC, za účelem sledování postupu reakce. Po 17,5 hodiny reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 91,0 %, formiátu 2,9 % a oxalátu 2,9 % a obsah zbývajících glykolátu je 4,1 %. Zbytková aktivita glykolát oxidasy je 63 % a katalasy 91 % jejich původní hodnoty. Koncová hodnota pH reakční směsi je 6,7.

Výsledná směs glyoxylové kyseliny (0,46M) a AMPA (0,40M) se přefiltruje v koncentračním zařízení Amicon Centriprep 10 (vylučovací mez molekulové hmotnosti 10000), aby se odstranily rozpustné enzymy a potom se filtrát umístí do 85ml Fischer-Porterovy láhve vybavené magnetickou míchací tyčinkou. Do této láhve se přidá 0,100 g 10% paladia na uhlíku, láhev se uzavře, propláchne dusíkem a potom se do ní uvede vodík do tlaku 343 kPa, načež se vzniklá směs míchá

při 25 °C. Koncentrace N-(fosfonomethyl)glycinu (stanovená HPLC) je po 17 hodinách reakce 0,29M (72% výtěžek, vztaženo na AMPA).

P ř í k l a d 9

Enzymatická oxidace glykolové kyseliny, která je popsána v příkladu 8, se opakuje za použití 10 ml vodného roztoku obsahujícího glykolovou kyselinu (0,75M), aminomethylfosfonovou kyselinu (AMPA, 0,60M), FMN (0,01mM), kyselinu máselnou (vnitřní standard pro HPLC, 0,10M), glykolát oxidasu (ze špenátu, 2,0 IU/ml) a katalasu (z *Aspergillus niger*, 14000 IU/ml) při pH 8,5. Po 40 hodinách reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 83,2 %, formiátu 2,3 % a oxalátu 7,5 % a obsah zbývajícího glykolátu je 0 %. Zbytková aktivita glykolát oxidasy je 65 % a katalasy 86 % jejich původní hodnoty. Koncová hodnota pH reakční směsi je 6,8.

Výsledná směs glyoxylové kyseliny (0,62M) a AMPA (0,60M) se přefiltruje v koncentračním zařízení Amicon Centriprep 10 (vylučovací mez molekulové hmotnosti 10000), aby se odstranily rozpustné enzymy a potom se filtrát umístí do 85ml Fischer-Porterovy láhve vybavené magnetickou míchací tyčinkou. Do této láhve se přidá 0,100 g 10% paladia na uhlíku, láhev se uzavře, propláchne dusíkem a potom se do ní uvede vodík do tlaku 343 kPa, načež se vzniklá směs míchá při 25 °C. Koncentrace N-(fosfonomethyl)glycinu (stanovená HPLC) je po 24 hodinách reakce 0,42M (70% výtěžek, vztaženo na AMPA).

P ř í k l a d 1 0

Enzymatická oxidace glykolové kyseliny, která je popsána v příkladu 8, se opakuje za použití 10 ml vodného roztoku obsahujícího glykolovou kyselinu (1,0M), aminomethylfosfonovou kyselinu (AMPA, 0,80M), FMN (0,01mM), kyselinu máselnou (vnitřní standard pro HPLC, 0,10M), glykolát oxidasu (ze špenátu, 2,0 IU/ml) a katalasu (z *Aspergillus niger*, 14000 IU/ml) při pH 8,5. Po 66 hodinách reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 78,9 %, formiátu 2,2 % a oxalátu 12,1 % a obsah zbývajícího glykolátu je 2,0 %. Zbytková aktivita glykolát oxidasy je 64 % a katalasy 87 % jejich původní hodnoty. Koncová hodnota pH reakční směsi je 6,9.

Výsledná směs glyoxylové kyseliny (0,79M) a AMPA (0,80M) se přefiltruje v koncentračním zařízení Amicon Centriprep 10 (vylučovací mez molekulové hmotnosti 10000), aby se odstranily rozpustné enzymy a potom se filtrát umístí do 85ml Fischer-Porterovy láhve vybavené magnetickou míchací tyčinkou. Do této láhve se přidá 0,100 g 10% paladia na uhlíku, láhev se uzavře, propláchne dusíkem a potom se do ní uvede vodík do tlaku 343 kPa, načež se vzniklá směs míchá při 25 °C. Koncentrace N-(fosfonomethyl)glycinu (stanovená HPLC) je po 23 hodinách reakce 0,51M (65% výtěžek, vztaženo na glyoxylovou kyselinu).

P ř í k l a d 1 1

Reakce podle příkladu 8 se opakuje při pH 8,0. Po 17,5 hodiny reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 87,0 %, formiátu 2,2 % a oxalátu 1,9 % a obsah zbývajícího glykolátu je 8,5 %. Zbytková aktivita glykolát oxidasy je 44 % a katalasy 97 % jejich původní hodnoty.

P ř í k l a d 1 2

Reakce podle příkladu 8 se opakuje při pH 7,0. Po 17,5 hodiny reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 88,0 %, formiátu 1,4 % a oxalátu 1,9 % a obsah zbývajícího glykolátu je 8,2 %. Zbytková aktivita glykolát oxidasy je 44 % a katalasy 93 % jejich původní hodnoty.

P ř í k l a d 1 3

Do 85ml Fischer-Porterovy skleněné aerosolové reakční nádoby se umístí magnetická míchací tyčinka a 10 ml vodného roztoku obsahujícího glykolovou kyselinu (0,50M), FMN (0,01mM), kyselinu isomáselnou (vnitřní standard pro HPLC, 0,10M), glykolát oxidasu (ze špenátu, 1,0 IU/ml) a katalasu (z *Aspergillus niger*, 14000 IU/ml) při pH 8,5. Reakční nádoba se uzavře, směs uvnitř se ochladí na 5 °C a potom se nádoba propláchne kyslíkem tím, že se uvede kyslík až do tlaku 481 kPa a potom se tlak uvolní na tlak atmosférický, přičemž tento postup se provádí za míchání a opakuje se 5x. Potom se do nádoby uvede znovu kyslík až do tlaku 481 kPa a směs se míchá při 5 °C. Vzorkovacím otvorem se z nádoby injekční stříkačkou odebírají alikvotní vzorky (0,10 ml) (bez poklesu tlaku v nádobě) v pravidelných intervalech a tyto vzorky se analyzují HPLC, za účelem sledování postupu reakce. Po 21 hodinách reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 81,7 %, formiátu 1,2 % a oxalátu 2,2 % a obsah zbývajícího glykolátu je 7,5 %. Zbytková aktivita glykolát oxidasy je 19 % a katalasy 77 % jejich původní hodnoty. Tato reakce se potom opakuje za použití 0,50M glykolové kyseliny a 0,25M, 0,375M, 0,40M, 0,50M nebo 0,625M aminomethylfosfonové kyseliny (AMPA). Výtěžky reakčních produktů a regenerovaných enzymů při těchto reakcích jsou uvedeny v následující tabulce:

AMPA (M)	glyoxylát (%)	formiát (%)	oxalát (%)	glykolát (%)	glykolát oxidasa (%)	katalasa (%)
0,00	81,7	1,2	2,2	7,5	19	77
0,25	79,4	2,1	3,3	2,5	48	79
0,375	78,3	2,3	3,6	1,7	57	95
0,40	91,0	2,9	2,9	4,1	63	91
0,50	85,2	1,5	3,3	5,5	49	93
0,625	79,6	1,7	1,8	14,0	42	94

P ř í k l a d 1 4

Enzymatická oxidace glykolové kyseliny, která je popsána v příkladu 8, se opakuje za použití 10 ml vodného roztoku obsahujícího glykolovou kyselinu (0,25M), aminomethylfosfonovou kyselinu (AMPA, 0,263M), FMN (0,01mM), kyselinu máselnou (vnitřní standard pro HPLC, 0,25M), glykolát oxidasu (ze špenátu, 1,0 IU/ml) a katalasu (z *Aspergillus niger*, 14000 IU/ml) při pH 7,0 a při teplotě 15 °C. Po 8 hodinách reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 82,8 %, formiátu 0,9 % a oxalátu 2,1 % a obsah zbývajícího glykolátu je 13,9 %. Koncová hodnota pH reakční směsi je 6,6.

Výsledná směs glyoxylové kyseliny (0,21M) a AMPA (0,263M) se přefiltruje v koncentračním zařízení Amicon Centriprep 10 (vylučovací mez molekulové hmotnosti 10000), aby se odstranily rozpustné enzymy a potom se filtrát a 50 mg 10% paladia na uhlíku umístí do tlakové nádoby z nerezové oceli, zevnitř obložené sklem. Nádoba se uzavře, propláchne dusíkem a potom se do ní uvede vodík do tlaku 6,87 MPa, načež se vzniklá směs třepe při 25 °C. Tlak uvnitř nádoby poklesne v průběhu první půlhodiny reakce na stálou

hodnotu a upraví se přivedeným vodíkem znovu na 6,87 MPa. Po 4 hodinách se tlak v nádobě uvolní a nádoba se propláchne dusíkem. Koncentrace N-(fosfonomethyl)glycinu (stanovená HPLC) je 0,16 M (76% výtěžek, vztaženo na glyoxylovou kyselinu).

P ř í k l a d 1 5

Enzymatická oxidace glykolové kyseliny, která je popsána v příkladu 14, se opakuje při pH 8. Po 8 hodinách reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 86,7 %, formiátu 1,8 % a oxalátu 4,1 % a obsah zbývajícího glykolátu je 13,2 %. Koncová hodnota pH reakční směsi je 6,7.

Výsledná směs glyoxylové kyseliny (0,22M) a AMPA (0,263M) se hydrogenuje za tlaku 6,87 MPa stejným postupem, jaký je popsán v příkladu 5. Po 4 hodinách je koncentrace N-(fosfonomethyl)glycinu (stanovená HPLC) je 0,14 M (64% výtěžek, vztaženo na glyoxylovou kyselinu).

P ř í k l a d 1 6

Enzymatická oxidace glykolové kyseliny, která je popsána v příkladu 14, se opakuje při pH 9. Po 7 hodinách reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 70,0 %, formiátu 5,6 % a oxalátu 11,1 % a obsah zbývajícího glykolátu je 0 %. Koncová hodnota pH reakční směsi je 6,8.

Výsledná směs glyoxylové kyseliny (0,18M) a AMPA (0,263M) se hydrogenuje za tlaku 6,87 MPa stejným postupem, jaký je popsán v příkladu 5. Po 4 hodinách je koncentrace N-(fosfonomethyl)glycinu (stanovená HPLC) je 0,094 M (52 % výtěžek, vztaženo na AMPA).

P ř í k l a d 1 7

Enzymatická oxidace glykolové kyseliny, která je popsána v příkladu 14, se opakuje při pH 8,5 za použití počáteční koncentrace glykolové kyseliny 0,50M a AMPA 0,40M. Po 16,5 hodiny reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 85,4 %, formiátu 3,5 % a oxalátu 6,3 % a obsah zbývajícího glykolátu je 1,4 %. Koncová hodnota pH reakční směsi je 7,0.

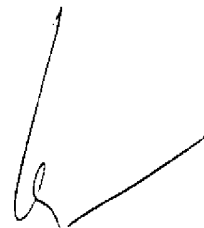
Výsledná směs glyoxylové kyseliny (0,43M) a AMPA (0,40M) se hydrogenuje za tlaku 6,87 MPa stejným postupem, jaký je popsán v příkladu 5. Po 4 hodinách je koncentrace N-(fosfonomethyl)glycinu (stanovená HPLC) je 0,30 M (75 % výtěžek, vztaženo na AMPA).

P ř í k l a d 1 8

Enzymatická oxidace glykolové kyseliny, která je popsána v příkladu 8, se opakuje za použití 10 ml vodného roztoku obsahujícího glykolovou kyselinu (0,50M), aminomethylfosfonovou kyselinu (AMPA, 0,375M), FMN (0,01mM), kyselinu máselnou (vnitřní standard pro HPLC, 0,10M), glykolát oxidasu (ze špenátu, 1,0 IU/ml) a katalasu (z *Aspergillus niger*, 14000 IU/ml) při pH 8,5. Po 17 hodinách reakce ukazuje HPLC obsah glyoxylátu 87,1 %, formiátu 1,9 % a oxalátu 2,1 % a obsah zbývajícího glykolátu je 8,9 %. Koncová hodnota pH reakční směsi je 6,7.

Výsledná směs glyoxylové kyseliny (0,435M) a AMPA (0,375M) se přefiltruje v koncentračním zařízení Amicon Centriprep 10 (vylučovací mez molekulové hmotnosti 10000), aby se odstranily rozpustné enzymy a potom se filtrát smíchá s 50 mg odbarvovacího uhlí (aby se odstranil FMN) a znovu se přefiltruje. Výsledný filtrát se umístí do 85ml Fischer-

Porterovy láhve vybavené magnetickou míchací tyčinkou. Do této láhve se přidá 0,100 g 10% paladia na uhlíku, láhev se uzavře, propláchne dusíkem a potom se do ní uvede vodík do tlaku 342 kPa, načež se vzniklá směs míchá při 25 °C. Koncentrace N-(fosfonomethyl)glycinu (stanovená HPLC) je po 17 hodinách reakce 372M (99% výtěžek, vztaženo na AMPA).



P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby N-(fosfonomethyl)glycinu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se hydrogenuje směs enzymaticky vyrobená reakcí glykolové kyseliny s kyslíkem ve vodném roztoku obsahujícím aminomethylfosfonovou kyselinu a enzymy glykolát oxidasu a katalasu.

2. Zlepšený způsob výroby N-(fosfonomethyl)-glycinu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje stupeň redukce směsi glyoxylové kyseliny a aminomethylfosfonové kyseliny hydrogenací, kterážto směs se enzymaticky připraví in situ ve vodném roztoku tak, že se do vodného roztoku glykolové kyseliny zavede první katalyzátor, který je schopen katalýzovat oxidaci glykolové kyseliny kyslíkem na glyoxylovou kyselinu a peroxid vodíku a druhý katalyzátor, který je schopen katalýzovat rozklad peroxidu vodíku, hodnota pH tohoto roztoku se nastaví do rozmezí od 6 do asi 10, roztok se uvede do styku se zdrojem kyslíku při účinné teplotě a po dobu postačující pro konverzi přinejmenším části složky glykolové kyseliny na složku glyoxylové kyseliny, za přítomnosti aminomethylfosfonové kyseliny a styk tohoto roztoku s kyslíkem se přeruší před redukčním stupněm.

3. Způsob podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že prvním katalyzátorem je glykolát oxidasa a druhým katalyzátorem je katalasa.

4. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se hydrogenace provádí za přítomnosti hydrogenačního katalyzátoru.

5. Způsob podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se hydrogenace provádí za přítomnosti hydrogenačního katalyzátoru.

6. Způsob podle nároku 4 nebo 5, v y z n a č u - j í c í s e t í m , že hydrogenační katalyzátor je zvolen ze souboru zahrnujícího paladium na uhlíku, nikl na k křemelině a Raneyův nikl.

7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že hydrogenační katalyzátor je přítomen v množství v rozmezí od 0,001 do 20 dílů hmotnostních, vztaženo na 100 dílů spojené hmotnosti použité glyoxylové kyseliny a aminomethylfosfonové kyseliny.

8. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se hydrogenace provádí při pH v rozmezí od 4 do 11 a teplotě v rozmezí od 0 do 150 °C a za tlaku vodíku v rozmezí od 0,1 do asi 10 MPa.

9. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se hydrogenace provádí při pH v rozmezí od 5 do 10 a teplotě v rozmezí od 20 do 90 °C a za tlaku vodíku v rozmezí od 0,1 do asi 1,0 MPa.

