

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

ES	444938	AT
FECHA DE PRESENTACION		

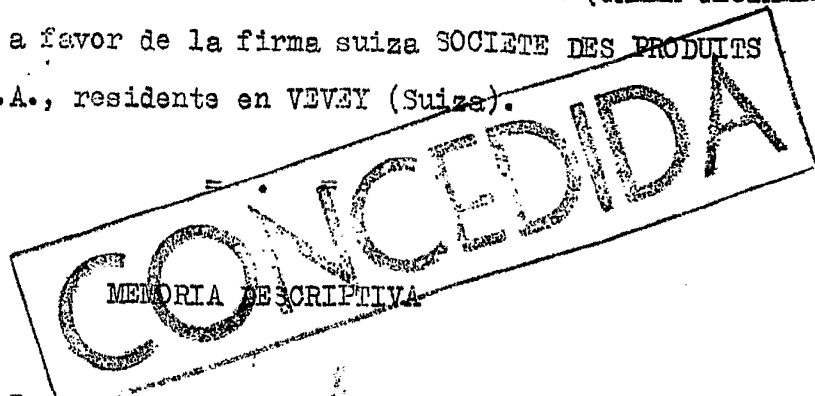
PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES (31) NUMERO 1536/75		(32) FECHA 7-2-75	(33) PAIS SUIZA
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C07C	(52) PATENTE DE DIVISIONARIA	
(54) TITULO DE LA INVENCION "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE EPSILON-(GAMA-GLUTAMIL)-LISINA"			
(71) SOLICITANTE (S) SOCIETE DES PRODUITS NESTLE, S.A.			
DOMICILIO DEL SOLICITANTE VEVEY (Suiza)			
(72) INVENTOR (ES) D. Paul André FINOT - D. Pierre HIRSBRUNNER - Raymond BERTHOLET			
(73) TITULAR (ES) SOCIETE DES PRODUITS NESTLE, S.A.			
(74) REPRESENTANTE D. JAIME ISERN CUYAS, Agente Oficial de la Propiedad Industrial.			

CONCEDIDA
14 ENE. 1977

P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE EPSILON-(GAMMA-GLUTAMIL)-
-LISINA", a favor de la firma suiza SOCIETE DES PRODUITS
NESTLE, S.A., residente en VEVEY (Suiza).



La presente invención ha logrado un procedimiento de preparación de épsilon-(gamma-glutamil)-lisina a partir del glutamato de lisina.

- La ϵ - γ -glutamil)-lisina - épsilon-(gamma-gluta-
5. mil)-lisina - es uno de los posibles productos de condensación de la lisina, aminoácido básico esencial, con el ácido glutámico, aminoácido ácido. Indicaremos que no es un péptido en el sentido tradicional de la palabra, pues la lisina está unida por su grupo amino en posición épsilon y el ácido
10. glutámico por su grupo carboxílico en posición gamma, cuando

los verdaderos péptidos y las proteínas están constituidas en principio por aminoácidos condensados por sus grupos amino carboxílico en posición alfa.

- Este épsilon-derivado de la lisina, sin embargo,
5. presenta un interés particular como aditivo dietético, pues se puede utilizar en lugar de la L-lisina o de péptidos y proteínas ricas en lisina para enriquecer los productos alimenticios pobres en lisina, como son los cereales, del modo que se señala en la solicitud de patente alemana Nº 2 423 089.
10. Por esta razón se comprende el interés que tiene una síntesis práctica y económica. Debido al gran número de lugares de reacción amino y ácido carboxílico, así como a la tendencia del ácido glutámico a ciclarse dando ácido pirroli-don-carboxílico o piroglutámico, infortunadamente la síntesis por unión directa de los dos aminoácidos elementales, so-
15. lamente es posible acudiendo a los métodos clásicos de la síntesis química de los péptidos, que consiste en proteger determinados lugares de reacción, mientras se activan otros, y en separar los grupos protectores, recíprocamente activa-
20. dos, una vez acabada la reacción de las sustancias presentes, siguiéndose de ello la multiplicidad de etapas y los rendimientos modestos. Además, estos grupos se separan en este caso, mediante hidrogenólisis con paladio para evitar reagrupaciones (ver por ejemplo J. Biol. Chem. 248 (8), 2536, 1973), lo cual trae como consecuencia un coste de fabrica-
25. ción alto.

En cambio, la presente invención permite la fabricación de épsilon-(gamma-glutamil)-lisina a precio moderado. Ha logrado un procedimiento de fabricación de este producto

a partir de glutamato de lisina, caracterizado porque se calienta el glutamato de lisina con la ayuda de un fluido transportador inerte, a una temperatura de 120°C por lo menos y durante 5 horas al menos, y después se aísla la épsilon-(gamma-glutamil)-lisina del producto de transformación así obtenido.

El glutamato de lisina es una sal del género carboxilato de alcohol-amonio cuyo punto de fusión es de 170-180°C (con descomposición). De conformidad con la invención, pierde una molécula de agua cuando se calienta, formándose la unión amida del épsilon-(gamma-glutamil)-lisina. Puede prepararse este glutamato de lisina partiendo de una mezcla de los dos aminoácidos que lo constituyen, por ejemplo, a partir de una mezcla equimolecular aproximadamente de glutamato monosódico y clorhidrato de lisina. Se disuelve esta mezcla en agua y se cristaliza la sal glutamato de lisina al adicionar metanol y sembrar algunos cristales de glutamato de lisina obtenidos de una preparación anterior, mientras se enfría ligeramente. Este glutamato de lisina contiene algunos tantos por cien de cloruro sódico. Se purifica disolviéndolo en agua y recristalizando mediante la adición de metanol y siembra a una temperatura próxima a 0°C.

Los cristales de glutamato de lisina así obtenidos, son del dihidrato de glutamato de lisina. Se ha observado que se presentan en dos fases sólidas, denominadas alfa y beta, que pueden ponerse de manifiesto mediante los espectros de difracción con rayos X (según Debye-Scherrer). La fase alfa es estable a 10°C y por debajo de esta temperatura, la fase beta es estable a una temperatura inferior a 60°C. La

fase obtenida en la preparación mencionada anteriormente es la alfa.

5. Se entiende por fluido termoportador a un fluido que tiene una doble función, la de transferir las calorías aportadas calentando al glutamato de lisina y la función de volante térmico. Se puede utilizar para esto un gas como aire o nitrógeno cuya temperatura esté regulada cuidadosamente (por ejemplo en el caso de emplear estufa). También se puede utilizar un líquido que, por supuesto, debe ser inerte frente al glutamato de lisina, es decir, no debe disolverlo ni siquiera parcialmente ni debe reaccionar químicamente con él. Se puede citar con estas condiciones, el queroseno, nonano, tetracloro-1,1,2,2 etano, octanol-1, etil-2 butanol-1, alcohol n-amílico o pentanol-1 y otros fluidos del mismo género que tienen los puntos de ebullición por encima de 120°C,
- 10.
15. temperatura necesaria para iniciar la transformación del glutamato de lisina.

- Los distintos parámetros que influyen en los rendimientos son, en primer lugar, la naturaleza del glutamato de lisina de origen (fase alfa o beta), la temperatura y la duración del calentamiento. En general, se observa que la fase alfa da rendimientos mejores que la fase beta, que la temperatura de calentamiento óptima se encuentra entre 135 y 150°C y que la duración óptima del calentamiento está comprendida entre 16 y 48 horas. Se calienta preferiblemente en atmósfera de nitrógeno o bajo corriente de nitrógeno. Se dan algunas indicaciones en el cuadro que sigue, donde los rendimientos indicados son rendimientos en épsilon-(gamma-glutamil)-lisina después de su aislamiento y purificación y donde
- 20.
- 25.

Am OH representa el alcohol n-amílico.

	Naturaleza del glutamato de lisina	Temperatura de calentamiento en grados C.	Naturaleza del fluido termoportador	Tiempo de calentamiento h.	Rendimientos %
5.		130	AmOH	16	31
		130	queroseno	16	28,5
	Fase alfa	140	AmOH	16	45
10.		140	AmOH	40	48
		150	nonano	8	27,5
		150	nonano	16	45
		160	nonano	16	35
	Fase beta	135	AmOH	16	25
		140	AmOH	16	31
15.		150	nonano	16	28

Estos rendimientos pueden parecer escasos, pero es preciso saber que pueden reciclarse los productos que no han reaccionado.

20. El fluido termoportador preferido es el alcohol n-amílico, pues su punto de ebullición a la presión atmosférica (138°C) corresponde a las temperaturas de calentamiento óptimas lo que permite realizar más cómodamente la transformación del glutamato de lisina, a reflujo con alcohol n-amílico. Además forma un azeótropo con el agua, que permite una eliminación fácil del agua formada en el transcurso de la transformación y a la vez, del alcohol n-amílico residual.

25. El producto de transformación obtenido es una mezcla que generalmente comprende del 40 al 50% de épsilon-(gamma-glutamil)-lisina, 25 a 35% de glutamato de lisina que no ha

- reaccionado, 10 a 15% de lisina, 2 a 5% de subproductos indefinidos, hallándose además el 10 al 15% de ácido glutámico combinado en forma de ácido piro-glutámico disuelto en el líquido termoportador. El aislamiento de la épsilon-(gamma-glutamil)-lisina consiste, por consiguiente, en separar en primer lugar el alcohol n-amílico del producto de transformación, por ejemplo por filtración. Seguidamente, se vuelve a introducir este producto en agua, después se elimina el resto del alcohol n-amílico por destilación azeotrópica con agua. Luego se recristaliza la épsilon-(gamma-glutamil)-lisina por enfriamiento y adición de metanol. Se recuperan las aguas madres para reciclado de la lisina y ácido glutámico en la misma proporción que el alcohol n-amílico y el metanol.

- El procedimiento de conformidad con la invención, se aplica exclusivamente para la preparación de épsilon-(gamma-glutamil)-lisina y no puede generalizarse para preparar derivados constituidos por el par aminoácido básico - aminoácido ácido, respectivamente, aparte de la lisina, la ornitina y la arginina y, aparte del ácido glutámico, el ácido N-acetil-glutámico, ácido aspártico y ácido piroglutámico.

Efectivamente, ciertas sales no se forman o no forman fase cristalina, por ejemplo, el N-acetil-glutamato de lisina, piroglutamato de ornitina o de arginina.

- Otras sales tienen un punto de fusión excesivamente bajo, como el piroglutamato de lisina que funde a 120°C.

Finalmente, otras no dan lugar a la transformación deseada, tal como se indica en el cuadro siguiente:

-

-

	Naturaleza de la sal	Tratamiento	Resultado
5.	aspartato de lisina	8 h/150°C	no hay transformación
		4 h/200°C	productos de descomposición
	glutamato de ornitina	8 h/140°C	no hay transformación
		3 h/170°C	productos de descomposición
10.	glutamato de arginina	3 h/160°C	productos de descomposición

El ejemplo siguiente ilustra la puesta en marcha del procedimiento de la invención. Desde el punto de vista de la utilización alimenticia de la épsilon-(gamma-glutamil)-lisina obtenida, los aminoácidos empleados en este ejemplo son naturales de la forma L. Se comprende que lo descrito también se aplica a los aminoácidos de forma D y que las propiedades del derivado obtenido son las mismas, excepto el poder rotatorio.

Ejemplo

20. Preparación del L-glutamato de L-lisina.

Se disuelven 187 g de monohidrato de L-glutamato monosódico y 182 g de clorhidrato de L-lisina en 0,4 l de agua a la temperatura ordinaria, después se añaden lentamente 1,4 l de metanol a la solución obtenida. Se siembra entonces con algunos cristales de L-glutamato de L-lisina.
 25. 2 H₂O, fase alfa, y también se añaden 0,6 l de metanol con fuerte agitación y se sigue agitando durante una hora aproximadamente. Después se centrifuga la suspensión obtenida y se tienen unos 3 l. de aguas madres de las que se recupera

el metanol y 365 g de dihidrato de L-glutamato de L-lisina que contiene alrededor del 1% de Cl Na.

- Se introduce esta sal en 0,8 l de agua, después de escurrir, y se añaden rápidamente 3 l. de metanol a la solución obtenida. Se siembra luego con algunos cristales de L-glutamato de L-lisina. $2 H_2 O$, fase alfa, y se enfría la solución que ha sido sembrada a 0°C, sin dejar de agitar vigorosamente. Transcurridas aproximadamente 4 horas, se centrifuga la suspensión obtenida y se tienen unos 4 l. de aguas madres de las que se recupera el metanol y, por otra parte, 350 g de dihidrato de L-glutamato de L-lisina, fase alfa, después de escurrir y secar. El rendimiento es del 90% aproximadamente.

Transformación en épsilon-(gamma-glutamil)-lisina.

15. Se suspenden los 350 g de dihidrato de L-glutamato de L-lisina, fase alfa, preparados anteriormente y que contienen todavía alrededor del 15% en peso de metanol, en 0,85 l. de alcohol n-amílico. Se opera en atmósfera inerte de nitrógeno. Entonces se calienta el alcohol n-amílico y así destila hacia los 70°C, en primer lugar, una mezcla ternaria que contiene alcohol n-amílico, metanol y agua (0,1 l. aproximadamente), después una mezcla binaria de alcohol n-amílico y agua (0,1 l. aproximadamente). Se termina calentando a reflujo el alcohol n-amílico, o sea a 138°C. Se separa por filtración el precipitado formado, después de 20 horas de duración total del calentamiento. Se recogen 400 g de producto en bruto que contienen épsilon-(gamma-glutamil)-lisina y alrededor de 1 l. de aguas madres amílicas de las que se recuperan 20 g de ácido L-piroglutámico para reciclar des-

pués de transformarlo en ácido L-glutámico; el alcohol n-amílico se purifica mediante reciclado.

Aislamiento de épsilon-(gamma-glutamil)-L-lisina.

5. Se suspenden los 400 g del producto en bruto que se acaban de obtener en 1,2 l de agua, se elimina después el alcohol n-amílico residual por destilación a presión reducida y a una temperatura entre 70 y 80°C.

10. De esta manera se recuperan 0,2 l. de una mezcla agua-alcohol n-amílico, siendo este último purificado y reciclado. Se añaden 0,8 l de metanol a la suspensión y se enfría a 20°C agitando. Se sigue la agitación una hora más, separándose después los cristales obtenidos. Se elimina el metanol de las aguas madres que lo contienen, siendo éste reciclado y, después de neutralizar a pH=7 con la ayuda del ácido L-glutámico, se utilizan aquéllas en lugar del agua para recristalizar el L-glutamato de L-lisina. Se lavan los cristales obtenidos con 50 ml de metanol y finalmente se secan. Se obtienen así 100 g de épsilon-(gamma-glutamil)-lisina, o sea que el rendimiento total es del 36%, comprendiendo la preparación de la sal. La pureza, determinada por cromatografía en capa fina y electroforesis, es del 98 a 99%.

$P_F = 245$ a 250°C con descomposición

$$[\alpha]_D^{25} = + 6,52 \quad (C=2; H_2O)$$

25. P_F , espectros IR y RMN idénticos a los de una muestra patrón.

REIVINDICACIONES

Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente suiza nº

5. 1536/75 del 7 de Febrero de 1975

1.- Procedimiento de preparación de épsilon-(gamma-glutamil)-lisina, a partir del glutamato de lisina, caracterizado porque se calienta el glutamato de lisina mediante un fluido termoportador inerte, a una temperatura de 120°C por lo menos y durante 5 horas al menos, y después se aísla la épsilon-(gamma-glutamil)-lisina del producto de transformación así obtenido.

15. 2.- Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado por seleccionarse como material de partida el L-glutamato de L-lisina.

3.- Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque se calienta dihidrato de glutamato de lisina, fase alfa, o el dihidrato de glutamato de lisina, fase beta.

20. 4.- Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el fluido termoportador es aire o nitrógeno cuya temperatura está regulada cuidadosamente.

25. 5.- Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el fluido termoportador inerte es queroseno, nonano, tetracloro-1,1,2,2 etano, octanol-1 ó etil-2-butanol-1.

6.- Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el fluido termoportador inerte

te es alcohol n-amílico.

7.- Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque preferentemente se calienta a una temperatura comprendida entre 135 y 150°C.

5. 8.- Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque se calienta durante un tiempo preferentemente comprendido entre 16 y 48 horas.

9.- Procedimiento de conformidad con una de las reivindicaciones 1 o 6, caracterizado porque en su realización se aísla épsilon-(gamma-glutamil)-lisina, separando ésta por filtración de una suspensión del producto de transformación en una mezcla metanol-agua.

10.

10.- Procedimiento de preparación de épsilon-(gamma-glutamil)-lisina.

15. Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 11 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a

6 FEB. 1976

p.a.

J A M E M O R I A

P. P.

Firmado: JOSE L. MORA