

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 709**

51 Int. Cl.:

C07D 209/20 (2006.01)

C01D 15/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2011 E 11717589 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2569282**

54 Título: **Procedimiento para la separación de triptófano**

30 Prioridad:

12.05.2010 DE 102010028916

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.12.2015

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**KESSLER, CHRISTIAN;
BLÜMKE, WILFRIED;
LOTTER, HERMANN y
POHLISCH, JOACHIM**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 554 709 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la separación de triptófano

5 La invención se refiere a un procedimiento para la separación de triptófano a partir de mezclas acuosas de sustancias, en particular caldos de fermentación en parte ya elaborados, con ayuda de la cromatografía en contracorriente simulada o SMB (siglas inglesas de lecho móvil simulado) y a un dispositivo para llevar a cabo el procedimiento.

Estado de la técnica

10 El triptófano se produce, por lo general, de modo fermentativo, es decir, con ayuda de microorganismos. Esto es válido, en particular, para su forma L biológicamente aprovechable. Después de la fermentación, la biomasa se extermina, se separa y el sobrenadante líquido se continúa elaborando. Al final de la cadena de purificación se produce, por lo general, una cristalización en la que el triptófano se obtiene en forma de un sólido muy puro mediante separación del sobrenadante líquido, las denominadas aguas madres. Éstas están saturadas de triptófano y, además, contiene todavía sales, otros aminoácidos, así como otros componentes orgánicos no definidos con mayor detalle que se han formado durante la fermentación.

15 Si después de la fermentación están presentes asimismo los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina en concentraciones nada despreciables, su separación del triptófano a partir de las aguas madres se configura dificultosa en virtud de las propiedades físico-químicas similares, de modo que a menudo las aguas madres son desechadas.

20 La patente de EE.UU. 5.300.653 describe la separación de aminoácidos aromáticos a partir de disoluciones acuosas mediante cromatografía de intercambio de cationes, sin indicar una forma determinada de realización del proceso. Los dos aminoácidos aromáticos, triptófano y fenilalanina, no pudieron separarse con el método allí descrito.

25 En una publicación de Ribeiro et al. en *Bioprocess Engineering* 12 (1995) 95 - 102 se describe la separación de triptófano a partir de mezclas con el aminoácido alifático serina e indol mediante adsorción selectiva de triptófano en diferentes carbones activos y adsorbentes a base de polímeros orgánicos, a pH 8,0. Entre otros, se utilizó el polímero XAD-7 (Rohm & Haas, Filadelfia, EE.UU.). El material de partida era una disolución a base de serina e indol, a partir de la cual se produjo triptófano con ayuda de microorganismos inmovilizados. La mezcla de separación no contenía, aparte de estas tres sustancias, otros aminoácidos o bien componentes similares a aminoácidos. La composición de la mezcla no está sometida, además, a oscilaciones, a diferencia de medios de partida producidos de forma fermentativa. La separación tuvo lugar de forma discontinua. Como agentes de desorción basados en agua y no orgánicos se describe una disolución de NaOH (0,05 M), así como una disolución de HCl (0,1 M). Una desorción con agua pura no se describe en este documento. De otro adsorbente (XAD-4, Rohm & Haas, Filadelfia, EE.UU.) triptófano se pudo desorber sólo mediante la adición de un disolvente orgánico, por ejemplo metanol o isopropanol.

30

35 En una publicación de Wu et al. en *Industrial and Engineering Chemistry Research* 37 (1998) 4023-4035 se describe la separación de una mezcla de dos sustancias definida de los aminoácidos aromáticos triptófano y fenilalanina sin gradiente de temperatura en agua. Como adsorbente se utilizó una resina PVP (poli-4-vinilpiridina, polímero Reillex HP, Vertellus Specialties Inc, Indianápolis, EE.UU.). Como desorbente se utilizó agua. La separación tuvo lugar análogamente al procedimiento en lecho móvil simulado de 4 zonas conocido, con un circuito de líquido interno cerrado. La misión de separación se simplifica de manera significativa mediante la mezcla de dos sustancias definida, ya que en el caso de ésta, a diferencia de disoluciones de partida preparadas de forma fermentativa, no pueden aparecer reacciones secundarias con compuestos adicionales no definidos.

40

45 La adsorción de aminoácidos en adsorbentes polímeros neutros se describió, además, por Doulia et al. en *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76 (2001) 83 - 89. En este caso, se observó que los aminoácidos aromáticos triptófano y fenilalanina se unen de la manera más intensa a los dos materiales adsorbentes XAD-2 y XAD-4 (Rohm & Haas, Filadelfia, EE.UU.). Un aumento del poder iónico en la disolución condujo a una adsorción reforzada. No obstante, no se proporcionaron datos con respecto a la desorción.

A partir del documento EP 1 106 602 B1 se conoce la separación de un aminoácido de carácter básico (L-lisina) con ayuda del procedimiento de la cromatografía en contracorriente simulada a partir de disoluciones que contienen L-lisina y otras impurezas.

Las columnas de cromatografía unidas en serie están cargadas con un intercambiador de cationes fuerte.

Sin embargo, los intercambiadores de cationes no son adecuados para una separación de triptófano, cuando las disoluciones contienen adicionalmente fenilalanina y/o tirosina, dado que éstas interactúan con el intercambiador de iones de forma equiparable.

- 5 En el documento US 5.071.560 se describe la adsorción selectiva de fenilalanina al polímero XAD-7 neutro, así como su desorción con agua, alcohol, cetonas o ésteres. En este método, la fenilalanina a adsorber es separada de otros componentes que no interactúan con el adsorbente y se disuelve de nuevo del adsorbente mediante desorción. Se utilizó un caldo de fermentación que, junto a fenilalanina, contiene de manera determinante sales, ácido láctico, así como otros aminoácidos no definidos con mayor detalle.
- 10 Los rasgos fundamentales del procedimiento SMB se describieron por vez primera en la patente de EE.UU. 2.985.589 (1961). En los últimos años se sometieron a ensayo una pluralidad de diferentes variantes del proceso. Visiones de conjunto se encuentran, por ejemplo, en "Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography" de Guiochon et al (Academic Press 2006, Nueva York, EE.UU.) o en Seidel-Morgenstern et al. Chemical Engineering and Technology 31 (2008) 826 – 837.
- 15 Una estrategia de SMB basada en composiciones cambiantes de disolventes (gradiente de disolvente) con tres zonas activas así como una zona tercerizada para la compensación de las oscilaciones del gradiente se describió, por ejemplo, por L. C. Keßler et al. en Journal of Chromatography A 1176 (2007) 69 - 78 con ayuda de la purificación de anticuerpos y proteínas. Determinante para el procedimiento es la utilización de diferentes concentraciones salinas para conseguir poderes de interacción diferentes. Como agentes de desorción servían disoluciones de cloruro de sodio de diferentes concentraciones.
- 20

Misión de la invención es proporcionar un procedimiento para la separación de triptófano a partir de mezclas acuosas de sustancias, en particular de las aguas madres que resultan después de la cristalización de triptófano a partir de caldos de fermentación y, con ello, aumentar el rendimiento de la fermentación de triptófano.

- 25 Objeto de la invención es un procedimiento para la separación de triptófano disuelto a partir de una mezcla acuosa de sustancias, en particular que contiene otros aminoácidos aromáticos, con ayuda de una variante de la cromatografía en contracorriente simulada o SMB, en la que, en un tramo de separación con una disposición de columnas consistente en más de una columna conectada en serie y cargada con un polímero orgánico adecuado como adsorbente, que está subdividida en varias, preferiblemente tres zonas funcionales,
- 30 a) la mezcla de sustancias con contenido en triptófano disuelto y agua se aporta continuamente como desorbente en puntos separados de la disposición de columnas y
- b) en un punto situado entre estas entradas se retira por separado la corriente de extractos enriquecida con triptófano y, en otro punto situado aguas arriba de la entrada de la mezcla de sustancias con contenido en triptófano, otra corriente de refinado que contiene compuestos a base de la mezcla de sustancias empleada, eventualmente se continúa elaborando y, preferiblemente
- 35 c) las columnas cargadas con compuestos no desorbidos a partir de la mezcla de sustancias se purifican de éstos

caracterizado por que se ajusta un gradiente de temperatura en la zona en la que se introduce el desorbente y la zona de la que se retira el refinado.

- 40 Enriquecido significa que la corriente de extractos contiene triptófano en una pureza mayor que en la mezcla de sustancias alimentada.

En una forma de realización, en el caso de la mezcla de sustancias se trata, en particular, de caldos de fermentación que resultan después de la fermentación de un microorganismo productor de triptófano que, junto a otras impurezas, contienen también fenilalanina y/o tirosina y de los que previamente se separó preferiblemente la biomasa.

- 45 Preferiblemente, el procedimiento de acuerdo con la invención se emplea a continuación de la cristalización, en la que el triptófano se obtiene en forma de un sólido muy puro y de éste se separa el sobrenadante líquido, las denominadas aguas madres. Éstas están saturadas de triptófano y contienen, además, todavía sales, otros

aminoácidos tales como, por ejemplo, fenilalanina y/o tirosina, así como otros compuestos no definidos con mayor detalle y que actúan como impurezas, que se han formado durante la fermentación. Estas aguas madres se separan en una variante preferida con el proceso reivindicado en

- 5 a) una corriente de producto (extracto) en la que se presenta la cantidad predominante del triptófano presente en las aguas madres y que está empobrecida al mismo tiempo fuertemente de sustancias perturbadoras, así como
- b) una corriente de desechos (refinado) en la que están presentes los componentes de las aguas madres adicionales no deseados.

En la Figura 1 se reproduce el esquema del proceso.

10 La corriente de producto obtenida se introduce de nuevo mediante concentración en la corriente principal del proceso de tratamiento del caldo de fermentación antes de la etapa de cristalización, eventualmente después de una concentración, y se continúa elaborando de esta forma. Si la corriente empleada es una disolución de fermentación exenta de células, la corriente de producto puede continuar elaborándose directamente como tal. Con ello, se aumenta el rendimiento de la preparación fermentativa de triptófano. Esto es parte de la invención.

15 El procedimiento de acuerdo con la invención puede reemplazar también a la cristalización descrita.

La separación tiene lugar con ayuda de un polímero orgánico que se caracteriza por una polaridad media. Como pudo demostrarse en la presente invención, este material está en condiciones de separar prácticamente por completo triptófano de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina y, al mismo tiempo, empobrecer fuertemente otras impurezas. A éstas pertenecen, en particular, también productos secundarios UV-activos ("UV-by products") que, en el caso de un procedimiento analítico estándar para impurezas según la Farmacopea Europea 6.3 eluyen antes ("UV-BP before") o después ("UV-BP after") del triptófano.

20

Como adsorbentes son adecuados, en particular, adsorbentes poliméricos no iónicos que adsorben de forma reversible triptófano de modo que su interacción con el triptófano es más intensa que con las impurezas. El triptófano retenido más intensamente puede ser desorbido de nuevo con agua en un intervalo de temperaturas preferido de 20 a aprox. 80°C, conduciendo una temperatura elevada a una desorción más rápida y, por consiguiente, a una retención menor de triptófano. Una gran parte de las impurezas orgánicas contenidas asimismo en los caldos de fermentación empleados tales como, p. ej., fragmentos de proteínas de origen microbiano o productos secundarios tales como fenilalanina o tirosina, no interactúan durante la etapa de separación que discurre de acuerdo con la invención o lo hacen claramente de manera más débil que el triptófano con el adsorbente, de modo que estos se pueden encontrar en la fracción que ha pasado o bien en el refinado. Otras impurezas se adsorben asimismo y permanecen adheridas en el adsorbente también después de la desorción con agua. Éstas son desorbidas en una etapa de purificación subsiguiente con disoluciones alcalinas o bien ácidas. A continuación, las columnas purificadas de este modo se conectan de nuevo en el proceso de separación. Adsorbentes adecuados comprenden polímeros del grupo de los materiales con contenido en grupos acilo/metacilo y polímeros a base de poliestireno.

25

30

35 Adsorbentes preferidos son polímeros acrílicos tales como, p. ej., XAD7, XAD7HP® (Rohm & Haas) o HP2MG® (Diaion).

Los adsorbentes particularmente adecuados muestran

- a) una cadena principal a base de acrilatos, preferiblemente metacrilatos, ácido acrílico y sus derivados
- b) una reticulación alifática, preferiblemente mediante monómeros polifuncionales
- 40 c) un momento dipolar que resulta de las dos propiedades arriba mencionadas que es más elevado que en el caso de los materiales basados en ST-DVB
- d) una estructura de poros macro-reticular
- e) una superficie elevada adecuada
- f) la ausencia de interacción mediante intercambio de iones.

No tiene lugar una carga del sistema de separación con disolventes orgánicos, dado que, conforme a la invención, para la separación sólo se requiere agua, en particular agua desmineralizada que se alimenta con una temperatura de 20 a ~ 98°C, preferiblemente 60 a 70°C. Esto posibilita una realización sencilla del proceso y evita una incorporación de sustancias extrañas adicionales. La reacción aparativa tiene lugar con una variante del proceso de "lecho móvil simulado" que se representa en la Figura 1.

Las columnas están conectadas entre sí con ayuda de construcciones de válvulas que están disponibles en el mercado y, en una forma de realización, después de transcurrido un tiempo determinado (el "tiempo de conexión") se mueven en círculo simultáneamente con ayuda de este circuito. En el presente caso, esto sucede mediante una válvula de conexión central de la razón social Knauer (Knauer Wissenschaftliche Gerätebau GmbH, Berlín). Sin embargo, el procedimiento también puede realizarse con otras construcciones de válvula, por ejemplo con válvulas de dos vías adecuadamente conectadas. La contracorriente de sustancias sólidas es simulada en el caso de este procedimiento mediante una variación de la posición de las entradas y salidas. En este caso, es también posible una conexión adicional no simultánea de las entradas y salidas conforme a la patente de EE.UU. 6.136.198. Otra posibilidad es la realización secuencial de las etapas descritas en lo que sigue, por ejemplo según el principio SMB secuencial (S. Baudouin y X. Lancrenon, Industries Alimentaires et Agricoles, 120, 2003, páginas 42-48)). En principio, el principio básico del procedimiento de acuerdo con la invención se puede adaptar a todas las variantes ya conocidas de la cromatografía continua y discontinua y, con ello, dota a ésta de nuevas funcionalidades.

La corriente de líquido recorre durante el funcionamiento SMB otras columnas de lecho fijo cargadas con adsorbente. El dispositivo de acuerdo con la invención se subdivide mediante la adición o bien retirada continua de las corrientes de alimentación, desorbente, extracto y refinado en tres zonas funcionales tal como muestra la Figura 1. Cada una de estas zonas asume en este caso una función de separación o bien tratamiento especial. Ventajoso en el sentido de la invención es, en el caso de utilizar mezclas a separar no definidas con precisión, un circuito de líquido abierto ("open loop"). Cada una de las zonas funcionales contiene en cada caso una a varias columnas cromatográficas.

Además, preferiblemente bajo la adición de una cuarta zona que se encuentra aguas arriba del lugar de retirada del refinado, puede realizarse también un circuito de líquido cerrado.

En el funcionamiento preferiblemente abierto de acuerdo con la invención del procedimiento SMB existen en general 3 corrientes cuantitativas internas (Q_I , Q_{II} y Q_{III}) y cuatro corrientes cuantitativas externas ($Q_{Alimentación}$, Q_{Des} , Q_{Ex} y Q_{Ra}), que están enlazadas entre sí a través de las siguientes ecuaciones de equilibrio

$$Q_I = Q_{Des}$$

$$Q_{II} = Q_I - Q_{Ex}$$

$$Q_{III} = Q_{II} + Q_{Alimentación} = Q_{Ra}$$

Para el establecimiento del punto de trabajo, las corrientes másicas o bien de volumen, así como el tiempo de cadencia t_s deben especificarse de manera que se resuelva el problema de la separación y, con ello, se alcance un funcionamiento óptimamente rentable manteniendo las unidades de producto predeterminadas. El tiempo de cadencia t_s determina en este caso la "velocidad" de la contracorriente de sólidos aparente y, con ello, de forma determinante, el éxito de la separación. El establecimiento de las corrientes puede realizarse de manera correspondiente al estado de la técnica de diferentes maneras tal como se describe, por ejemplo, en "Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography" de Guiochon et al. (Academic Press 2006, Nueva York, EE.UU.).

La contracorriente generada en el proceso SMB se aprovecha con el fin de separar el triptófano de una fracción mixta de las impurezas. La base son las diferentes velocidades de migración en cada caso de los compuestos, que se utilizan para dirigir la fracción mixta de las impurezas ("neutral waste") a dos salidas diferentes (Figura 1). A partir de la salida designada como "Extracto" se puede retirar durante todo el proceso la corriente de producto con contenido en triptófano, de la corriente designada como "Refinado" se separan las sustancias perturbadoras. Además, tiene lugar una adición continua de agua atemperada a través de la entrada de "Desorbente". El éxito de la separación se determina mediante una elección adecuada de las velocidades de flujo de las entradas y salidas, así como el tiempo de conexión.

- Conforme a la invención, en el tramo de separación consistente en tres zonas se mantiene un gradiente de temperatura. La aportación del agua atemperada tiene lugar con una temperatura por lo general mayor de 10 a 40°C que la disolución a separar, incorporada a través de la entrada de alimentación (mezcla de separación). Como ventajosas se han establecido temperaturas de alimentación del desorbente de al menos 60°C y de 45°C en la mezcla de separación.
- 5 El agua empleada como desorbente está preferiblemente totalmente desalinizada. Sin embargo, también es posible emplear agua con un contenido en sales, preferiblemente de 0,01 a 10% en peso, en particular de 0,01 a 3% en peso. El triptófano se separa también bajo estas condiciones. En este caso, no obstante, se ha de tener en cuenta que la corriente de extracto está cargada con esta sal.
- 10 Se emplean mezclas acuosas de sustancias, en particular disoluciones que contienen 0,1 a 39 g/l, en particular 0,5 a 38 g/l, de manera particularmente preferida 10 a 18 g/l de triptófano.
- El contenido depende particularmente de si deben elaborarse aguas madres u otras disoluciones de triptófano no purificadas, y a qué valor del pH se presentan éstas.
- 15 El valor del pH de las mezclas o disoluciones empleadas abarca de 2 a 9, en particular de 2,5 a 7 y se encuentra particularmente en 5,8.
- En el caso del procedimiento de acuerdo con la invención, paralelamente al proceso de separación, las columnas no requeridas para la separación en un funcionamiento regular son tratadas en un tramo de purificación ("cleaning part") con diferentes agentes, con el fin de eliminar del adsorbente impurezas fuertemente unidas al mismo así como malamente solubles.
- 20 Las columnas se tratan para ello primeramente con un agente de purificación de carácter básico acuoso adecuado. Adecuadas, sin limitarse a ello, son en particular disoluciones de hidróxido sódico en concentraciones de 0,05 a 1 M. Además de ello, pueden utilizarse otras disoluciones que están en condiciones según el estado de la técnica de liberar el adsorbente de impurezas fuertemente adheridas. Por ejemplo, sin estar limitado a ello, pueden mencionarse en este caso disolventes orgánicos miscibles con agua tales como, p. ej., etanol, metanol, acetona o isopropanol.
- 25 En otra etapa del proceso paralela, las columnas tratadas ya con el primer agente de purificación se aclaran con un medio adecuado. Éste es en particular agua desalinizada, pero también pueden utilizarse otras disoluciones acuosas con efecto tampón. En el caso de un agente de purificación adecuado puede renunciarse también a una etapa de lavado antes de la segunda purificación.
- 30 En otra etapa paralela las columnas tratadas ya con el primer agente de purificación y opcionalmente lavadas son puestas en contacto con un segundo medio de purificación. Particularmente adecuada es en este caso una disolución acuosa de carácter ácido, por ejemplo ácido sulfúrico 0,01 a 0,1, en particular 0,05 M. Además de ello, también pueden utilizarse otros medios de purificación que, según el estado de la técnica, están en condiciones de disolver mejor en un medio neutro o bien básico sustancias difícilmente solubles.
- 35 En otra etapa paralela, las columnas tratadas con los dos agentes de purificación son lavadas de nuevo o por primera vez con un medio acuoso adecuado. Éste es, en particular, agua desalinizada, pero también pueden utilizarse otras disoluciones acuosas.
- En una forma preferida de la invención, todas las etapas de purificación se llevan a cabo de forma continua y paralelamente a la separación en funcionamiento.
- 40 En otra forma de realización pueden eliminarse etapas parciales individuales.
- En otra forma de realización todas o sólo etapas de purificación elegidas pueden llevarse a cabo también de forma desacoplada de la separación. Así, por ejemplo, es posible una realización de la purificación en un ritmo acoplado sólo diariamente o a un tiempo de separación determinado.
- 45 Se describe también un dispositivo para la separación de compuestos orgánicos deseados a partir de una mezcla acuosa de sustancias con ayuda de la cromatografía en contracorriente simulada o SMB, con una conexión de

columnas consistente en más de una columna conectada en serie y cargada con un adsorbente, que está subdividida en tres zonas funcionales, en las que se realizan las siguientes misiones

- 5
 5 adición de la corriente de alimentación,
 retirada de la corriente de producto eluido,
 retirada de la corriente de refinado,
 adición de desorbente,

10 y en las que entre las zonas I y III se ajusta un gradiente de temperatura de 10 a 40°C, en particular de 15 a ~ 25°C conforme a la Figura 1, provocado por las diferentes temperaturas de entrada en el desorbente y la alimentación. El gradiente de temperatura favorece la separación y reduce el consumo de desorbente. Sin embargo, no está obligatoriamente prescrito para conseguir la separación.

15 Esta estructura se diferencia de los dispositivos conocidos en que en el tramo de separación están dispuestas columnas de cromatografía en una disposición de 3 zonas con un circuito de líquido abierto y un gradiente de temperatura, y esta parte de la instalación está acoplada con un tramo de purificación ("cleaning part") que contiene columnas con la misma carga de adsorbente, que se purifican de las impurezas adheridas de forma alternativa con las del tramo de separación.

20 El número de las columnas en las zonas abarca, por lo general, de más una a 32, en particular 16. Cada una de las zonas contiene al menos una columna. Su número total y distribución a lo largo de las zonas puede determinarse, mediante ensayos estándares, de forma adaptada a la temperatura, la concentración de triptófano, la velocidad de recorrido deseada y la pureza del producto. El número de columnas es influenciado, además, por el modo de realización del proceso y la puesta en funcionamiento del proceso SMB.

25 Con el procedimiento de acuerdo con la invención pudieron alcanzarse en ensayos de laboratorio, partiendo de aguas madres con concentraciones de triptófano entre 9 y 22 g/kg de aguas madres y purezas entre 7 y 15% (referidas a la masa total seca), corrientes de producto con una pureza media de más de 85%, un rendimiento en triptófano medio mejor que 85%, así como una concentración en triptófano de 4 a 5 g/kg en el extracto.

Con ello se consigue separar las cantidades de triptófano contenidas en las aguas madres en un porcentaje mayor en forma purificada y devolverlas de forma rentable al proceso de tratamiento del caldo de fermentación para mejorar el rendimiento global.

Descripción de la Fig. 1

30 La Fig. 1 reproduce una estructura esquemática y la disposición de columnas del proceso SMB empleado de acuerdo con la invención. La disposición está subdividida en una parte de separación (separation part) y una parte de purificación (cleaning part).

35 En la parte de separación se alimenta, por ejemplo, la corriente de desorbente Q_{Des} con 60°C y la mezcla $Q_{Alimentación}$ acuosa a separar con 45°C, y se retira el refinado Q_{Ra} y el extracto Q_{Ex} en el que está presente de forma separada el triptófano.

En la parte de purificación tiene lugar, por ejemplo en los puntos A y B, la aportación de agua, en el punto B la aportación de ácido sulfúrico 0,05 M, así como en el punto D la aportación de NaOH 0,5 M.

40 Después del recorrido a través de las columnas a purificar, del punto E sale ácido sulfúrico consumido, del punto F sale una disolución de impurezas solubles en agua y menos adheridas, del punto G sale NaOH consumido y del punto H sale una disolución con las impurezas fuertemente adheridas (CIP significa: limpieza en el lugar).

Ejemplos

1. Parámetros del procedimiento

45 Adsorbedor utilizado: Amberlite XAD-7 HP (Rohm & Haas)
 Dimensiones de la columna (d x L): 1,5 * 15 cm
 Instalación SMB: Knauer CSEP 916 (Knauer Wissenschaftliche Gerätebau GmbH, Berlín, Alemania)
 Bomba: Watson-Marlow U101 (Wilmington, MA, EE.UU.)
 Mezcla a separar: aguas madres de la cristalización:

Sustancia	Intervalo de concentraciones [g/kg]
Triptófano	12 – 22
Tirosina	1,2 – 2,1
Fenilalanina	1,1 – 4,8
Otros productos secundarios	220 – 260

5 De los parámetros mencionados, los otros son independientes tales como, p. ej., los tiempos de conexión considerados que se encontraban entre 8 y 14 minutos. No existe, sin embargo, motivo alguno de limitar éstos. Las corrientes utilizadas en la instalación de laboratorio oscilaban entre 0,07 y 0,33 kg/h, sin limitarse a ello, limitadas por las bombas de manguera utilizadas. También en este caso puede utilizarse cualquier tipo de bomba que esté en condiciones de suministrar los caudales requeridos para el rendimiento a alcanzar y que aseguren una separación.

Las temperaturas utilizadas oscilaban entre la temperatura ambiente (25°C) y 60°C, como ventajosa se ha establecido una temperatura del desorbente de al menos 60°C, pero no superior a 80°C, así como 45°C para las corrientes y columnas remanentes.

10 2. Ejemplos de aplicación:

2.1 Determinación del comportamiento de adsorción

15 En el marco de una campaña de medición se examinó el comportamiento de adsorción y desorción de triptófano, fenilalanina y tirosina con una de las columnas descritas en el párrafo 1. Para ello, se inyectaron 100 µL de la muestra en una corriente acuosa que recorre la columna y el tiempo de salida de los aminoácidos se detectó en la salida. Se pudo demostrar que el triptófano, entre los aminoácidos aromáticos, es retenido de la forma más intensa tanto en un medio neutro, ligeramente ácido, como también en un medio ácido. Un aumento de la temperatura condujo en el caso del triptófano a un acortamiento del tiempo de retención:

Tiempo de retención para triptófano a pH 5,9 (en minutos)

	45°C	60°C
5 g/kg	37,3	31,9
10 g/kg	37,1	31,1
17 g/kg	-	33,5

20

Tiempo de retención para fenilalanina a pH 5,9

	45°C	60°C
5 g/kg	15,6	15,3
10 g/kg	15,2	15,1

25 Los tiempos de retención para tirosina se encontraban en el mismo nivel que para fenilalanina. En el caso de un valor del pH de 2,5, 45°C y una concentración de 10 g/kg, el tiempo de retención para el triptófano se encontraba en 39,1 minutos, para fenilalanina, bajo las mismas condiciones, en 15,8 minutos. Por consiguiente, no es posible una separación tampoco en el caso de un valor de pH ácido.

2.2 Primera campaña experimental de SMB

30 En este caso, se examinaron experimentalmente tres puntos de trabajo. Como sustancias de partida sirvieron diferentes cargas de aguas madres del proceso con contenido en triptófano, así como las disoluciones descritas en el párrafo 1. Las condiciones eran:

ES 2 554 709 T3

	Q _{Des}	Q _{Alimentación}	Q _{Ex}	Q _{Ra}	t _s
Punto de trabajo 1	5,49 g/min	1,18 g/min	3,21 g/min	3,47 g/min	14,0 min
Punto de trabajo 2	5,74 g/min	1,26 g/min	3,30 g/min	3,69 g/min	12,9 min
Punto de trabajo 3	5,59 g/min	1,27 g/min	3,26 g/min	3,60 g/min	12,75 min

La temperatura del desorbente ascendió a 60°C, la de las columnas así como las de las otras disoluciones, a 45°C. Los resultados de los ensayos eran:

5

	Pureza TRP (masa seca) [%]	Rendimiento de TRP [%]	Separación de PHE [%]	Separación de TYR [%]	Separación de UV BP antes [%]	Separación de UV BP después [%]
Punto de trabajo 1	87,1	37	100	100	n.m.	n.m.
Punto de trabajo 2	82,2	76	100	100	92,4	34,9
Punto de trabajo 3	87,6	85	99,1	96,1	93,5	41,8

2.3 Ensayo de 12 días

En otra campaña se evaluó la estabilidad a largo plazo. A lo largo de un espacio de tiempo del ensayo de 12 días se hizo funcionar el proceso con los siguientes parámetros:

Q _{Des}	Q _{Alimentación}	Q _{Ex}	Q _{Ra}	t _s
5,6 g/min	1,3 g/min	3,26 g/min	3,60 g/min	12,75 min
Q _{NaOH}	Q _{Lavado básico}	Q _{H2SO4}	Q _{Lavado ácido}	
2,35 g/min	1,91 g/min	2,89 g/min	2,02 g/min	

10 Como sustancias de partida servían aguas madres de la cristalización del triptófano. En el transcurso del proceso pudieron alcanzarse purezas medias de 89,3% (referido a la masa seca total) así como rendimientos de 90,4% (referido a la masa de triptófano incorporada). Las concentraciones de fenilalanina y tirosina pudieron reducirse, por término medio, a 0,002 o bien 0,001 g/l. Pudo realizarse con éxito un retorno a la cristalización del triptófano y no se manifestaron efectos negativos.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la separación de triptófano a partir de una mezcla acuosa de sustancias, con ayuda de la cromatografía en contracorriente simulada o SMB, en el que, en un tramo de separación con una disposición de columnas consistente en más de una columna conectada en serie y cargada con un polímero orgánico adecuado como adsorbente, que está subdividida en varias, preferiblemente tres zonas funcionales,
- a) la mezcla de sustancias con contenido en triptófano disuelto y agua se aporta continuamente como desorbente en puntos separados de la disposición de columnas y
- 10 b) en un punto situado entre estas entradas se retira por separado la corriente de extractos enriquecida con triptófano y, en otro punto situado aguas arriba de la entrada de la mezcla de sustancias con contenido en triptófano, otra corriente de refinado que contiene compuestos a base de la mezcla de sustancias empleada, eventualmente se continúa elaborando y, preferiblemente
- c) las columnas cargadas con compuestos no desorbidos a partir de la mezcla de sustancias se purifican de éstos,
- 15 caracterizado por que se ajusta un gradiente de temperatura en la zona en la que se introduce el desorbente y la zona de la que se retira el refinado.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que preferiblemente se aporta agua desalinizada con una temperatura de 20 a 98°C.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se emplea una mezcla de sustancias que contiene triptófano en una concentración de 0,1 a 39 g/l.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se emplea una mezcla de sustancias que presenta un valor del pH de 2,5 a 9.
5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, en el que se emplea una mezcla de sustancias obtenida mediante fermentación que contiene junto a triptófano también fenilalanina y/o tirosina.
- 25 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que como mezcla de sustancias se emplean las aguas madres que precipitan durante la cristalización de triptófano a partir del caldo de fermentación.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que como adsorbente se emplea un polímero no iónico que adsorbe triptófano de forma reversible y del que el triptófano se desorbe con agua en el intervalo de temperaturas de 10 a aprox. 98°C.
- 30 8. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, en el que se emplean adsorbentes elegidos del grupo XAD7®, XAD7HP® y HP2MG®.
9. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8, en el que la separación se deja que discurra de forma continua.
10. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8, en el que la separación se deja que discurra de forma semi-continua.
- 35 11. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 11, en el que paralelamente a la separación del triptófano, las columnas de la disposición, desconectadas de la separación en función del tiempo de cadencia, se tratan a continuación, en un tramo de purificación, con compuestos desorbentes.
12. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 12, en el que en el tramo de purificación el adsorbente se trata en un procedimiento que comprende las siguientes etapas, en donde
- 40 a) las columnas para ello se tratan primeramente con un agente de purificación acuoso de carácter básico adecuado, en particular disoluciones de hidróxido sódico en concentraciones de 0,05 a 1 M, eventualmente combinado

- b) en otra etapa del proceso paralela, las columnas eventualmente tratadas conforme a a) se lavan con un medio acuoso elegido de agua, preferiblemente desalinizada o disoluciones acuosas con efecto tampón,
- c) en otra etapa paralela, las columnas tratadas conforme a a) y b) se ponen en contacto con un segundo medio de purificación acuoso, en particular con una disolución acuosa de carácter ácido, preferiblemente ácido sulfúrico 0,01 a 0,05 M, y
- d) en otra etapa paralela, las columnas tratadas se lavan eventualmente con un medio acuoso elegido de agua preferiblemente desalinizada, o disoluciones acuosas que se pueden utilizar como tampón.
13. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 11, en el que a la corriente de extracto con contenido en triptófano se le añade una mezcla acuosa de sustancias con contenido en triptófano obtenida mediante fermentación, antes de que de ella se separe por cristalización el triptófano.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, desacopladas de la separación, se llevan a cabo a un ritmo establecido.

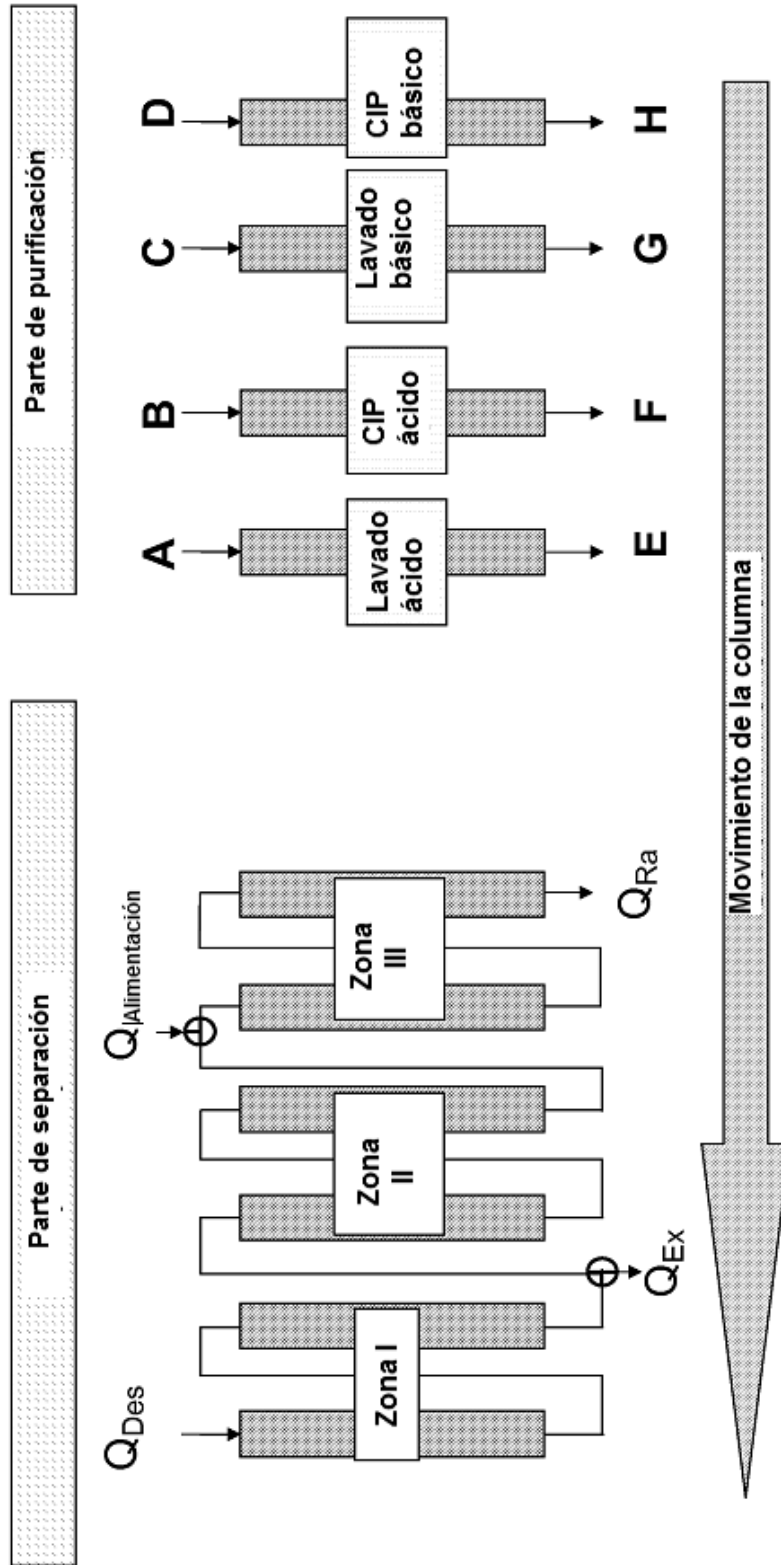


Fig. 1 Esquema del proceso SMB