(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 688 556**

(51) Int. Cl.:

C12P 13/04 (2006.01)
C07C 227/42 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2015** **PCT/EP2015/068221**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016** **WO16020510**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2015** **E 15750357 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018** **EP 3177731**

(54) Título: **Procedimiento de obtención de L-alanina cristalina**

(30) Prioridad:

08.08.2014 EP 14180364

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2018

(73) Titular/es:

BASF SE (100.0%)
Carl-Bosch-Strasse 38
67056 Ludwigshafen am Rhein, DE

(72) Inventor/es:

BAUMANN, DIETER;
WLOCH, SEBASTIAN;
GARELLA, LINDA y
SENGPIEL, ROBERT

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 688 556 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 de obtención de L-alanina cristalina

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de L-alanina cristalina a partir de una solución acuosa de L-alanina, en particular a partir de una solución acuosa de L-alanina, que se obtiene de un proceso de fermentación.

Antecedentes de la invención

La L-alanina, también denominada ácido (S)-2-aminopropiónico es un aminoácido proteinogénico, que puede ser usado en nutrición clínica o como un ingrediente para productos farmacéuticos tales como agentes terapéuticos para la hipertrofia de próstata. También se usa en la industria alimentaria para enriquecer la nutrición en alimentos y bebidas saludables. Además, L-alanina puede usarse como un suplemento para el cultivo celular. Además de eso, la L-alanina se puede usar como material de partida en la producción de otros productos químicos, tales como ácido metilglicídico diacético. La L-alanina se fabrica frecuentemente usando catálisis enzimática o procesos de fermentación (véase, por ejemplo, Xueli Zhang y col., Production of Lalanine by metabolically engineered Escherichia coli, Appl. Microbiol. Biotechnol. (2007) 77:355-366 y la literatura allí citada; Ullmann's Fine Chemicals, Wiley-VCH, Weinheim 2013, Vol. 1, páginas 179 y siguientes y la literatura citada en este documento). D. Lechuaga-Ballesteros et. al., Journal of coloide and interface science, Vol. 157, 1993, páginas 147-153, divulga un procedimiento para cristalizar L-alanina.

En los procesos de fabricación, la L-alanina se obtiene habitualmente como una solución acuosa, a partir de la cual se puede aislar mediante secado por atomización o cristalización. Sin embargo, el secado por atomización de una solución acuosa que contiene L-alanina da como resultado inicialmente un polvo sólido amorfo que tiene características de flujo insatisfactorias y malas propiedades de almacenamiento, ya que el polvo puede sufrir apelmazamiento y convertirse en grumos sólidos, que son difíciles de manipular.

Cuando se trata de aislar L-alanina de la solución acuosa por cristalización, se enfrentan varios problemas. Un problema es la tendencia de la L-alanina a formar soluciones acuosas sobresaturadas, que se pueden cristalizar espontáneamente para formar un material sólido impuro. Un segundo problema es que tras la cristalización de L-alanina a partir de una solución acuosa, se obtiene un material de aguja o con forma barra, que es difícil de filtrar. Debido a su alta proporción de aspecto y la alta superficie específica resultante, dicha aguja o material en forma de barra contiene grandes cantidades de licor madre y, por lo tanto, solo tiene una pureza moderada y requiere un esfuerzo de secado adicional. La formación de un material en forma de aguja o de barra es particularmente problemática, si la solución acuosa de L-alanina proviene de un proceso de producción fermentativa.

Los inventores de la presente invención encontraron que la formación de cristales en forma de aguja o barra se puede atribuir a la presencia de impurezas orgánicas, en particular α-aminoácidos diferentes de L-alanina, tales como D-alanina y ciertos L-aminoácidos, por ejemplo L-valina, L-leucina, L-lisina, L-asparagina, L-glutamina y L-arginina, especialmente a la presencia de L-valina. Los inventores han descubierto que el efecto perjudicial de estos α-aminoácidos sobre la cristalización de L-alanina puede causar tales problemas incluso a concentraciones muy bajas de 100 ppm, en base al peso de L-alanina, o inferiores. Por otra parte, los procesos de producción de L-alanina normalmente contienen α-aminoácidos diferentes de L-alanina en cantidades significativas, por ejemplo en cantidades de 1.000 ppm, en base a L-alanina, o superior. Estas impurezas pueden ser el resultado de una racemización o pueden formarse como subproductos en el proceso de producción.

Sumario de la invención

Existe una gran necesidad de procedimientos que permitan obtener L-alanina cristalina en la forma de cristales compactos, es decir, cristales que tienen una baja proporción de aspecto, a partir de una solución acuosa de L-alanina que contiene al menos 100 ppm, en base a L-alanina, de uno o más α-aminoácidos diferentes de L-alanina.

Se ha encontrado sorprendentemente que este y otros objetos se logran mediante un procedimiento que implica inducir en la solución de L-alanina de las condiciones de una supersaturación controlada de una manera que la proporción c: c * de la concentración c de L-alanina disuelta a la solubilidad c* en equilibrio de L-alanina bajo las condiciones de supersaturación controlada es de > 1:1 a 1,5:1, frecuentemente de> 1:1 a 1,3:1, en particular de> 1:1 a 1,15:1, especialmente de > 1:1 a 1,10:1.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de L-alanina cristalina a partir de una solución acuosa de L-alanina que contiene al menos 100 ppm, por ejemplo de 100 a 30.000 ppm, en particular de 200 a 10.000 ppm o de 500 a 5.000 ppm, en base a L-alanina, de uno o más a-aminoácidos diferentes de L-alanina, comprendiendo el procedimiento:

a) proporcionar una solución acuosa de L-alanina que contiene al menos 100 ppm, en particular al menos 200 ppm o al menos 500 ppm, por ejemplo de 100 a 30.000 ppm, en particular de 200 a 10.000 ppm o de 500 a 5.000 ppm, en

base a L-alanina, de uno o más α-aminoácidos diferentes de L-alanina;

b) someter la solución acuosa de L-alanina a una cristalización induciendo condiciones de supersaturación controlada de manera que la proporción c:c* de la concentración c de L-alanina disuelta a la solubilidad de equilibrio c* de L-alanina bajo las condiciones de supersaturación controlada son de> 1:1 a 1,5:1, frecuentemente de> 1:1 a 1,3:1, en particular de> 1:1 a 1,15:1, especialmente de> 1:1 a 1,10:1, afectando así la cristalización de L-alanina;

c) separar L-alanina cristalina del licor madre,

donde la solución acuosa de L-alanina se alimenta a un aparato de cristalización operado en continuo, que contiene una suspensión acuosa de cristales de L-alanina.

Mediante el procedimiento de la invención, se obtiene L-alanina cristalina pura en la forma de cristales compactos que tienen habitualmente una proporción de aspecto (proporción de longitud a espesor) generalmente inferior a 10:1, en particular inferior a 5:1 o incluso más bajo que 2:1. El tamaño de partícula promedio del material cristalino está generalmente en el intervalo de 0,2 a 1,5 mm, en particular de 0,3 a 1,0 mm, en el que el tamaño de partícula promedio es el tamaño de partícula promedio en peso determinado por procedimientos de dispersión de luz o tamizado de acuerdo con DIN 66165-2:1987-04. Preferiblemente, la L-alanina cristalina obtenida por el proceso de la invención contiene menos del 10 % en peso de partículas que tienen un tamaño de partícula inferior a 100 mm.

La cantidad de impurezas contenidas en la L-alanina cristalina, que se obtiene mediante el procedimiento de la invención, es generalmente inferior a 10.000 ppm, en particular inferior a 8.000 ppm, en base a L-alanina sólida.

Descripción detallada de la invención

En un primer paso a) del procedimiento de la invención, se proporciona una solución acuosa de L-alanina que luego se somete a una cristalización en el según paso b). Principalmente, se puede usar cualquier solución de L-alanina en el procedimiento de la invención. La solución acuosa puede ser una solución acuosa obtenida de un proceso bioquímico o de un proceso convencional. La solución acuosa usada en el procedimiento de la invención se obtiene preferiblemente a partir de un proceso bioquímico, tal como un proceso, en el que se obtiene L-alanina mediante una transformación enzimática biocatalítica a partir de N-acetil-D, L-alanina o de ácido L-aspártico (véase A. Liese, et al., "Industrial biotransformations ", Wiley-VCH, 2000, páginas 300 y sigs. y la literatura citada aquí) o mediante una fermentación de una fuente de carbohidratos, como se divulga, por ejemplo en Xueli Zhang et al., Production of L-alanine by metabolically engineered Escherichia coli, Appl. Microbiol. Biotechnol. (2007) 77:355 - 366 y la literatura citada aquí.

De acuerdo con la invención, la solución acuosa de L-alanina, que se proporciona en el paso a) del procedimiento de la invención, contiene al menos 100 ppm, por ejemplo de 100 a 30.000 ppm, en particular de 200 a 10.000 ppm o de 500 a 8.000 ppm, en base a L-alanina contenida en la solución acuosa, de uno o más α-aminoácidos diferentes de L-alanina. Ejemplos de tales aminoácidos son en particular α-aminoácidos diferentes de L-alanina, tales como D-alanina y ciertos L-aminoácidos, por ejemplo L-valina, L-leucina, L-lisina, L-asparagina, L-glutamina y L-arginina y mezclas de los mismos. Con frecuencia, la solución acuosa de L-alanina, que se proporciona en el paso a), contiene L-valina. La solución acuosa de L-alanina, que se proporciona en el paso a), también puede contener otras impurezas orgánicas e inorgánicas. Dichas impurezas pueden ser ácidos orgánicos diferentes de los aminoácidos, tales como ácido pirúvico, ácido succínico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido acético o ácido propiónico, y sales inorgánicas tales como fosfatos, sulfatos, hidróxidos de metal alcalino, sales de amonio y similares. La cantidad total de impurezas generalmente no excederá 50.000 ppm, en base a L-alanina contenida en la solución acuosa.

Se ha encontrado beneficioso, si la solución acuosa de L-alanina, que se proporciona en el paso a), está esencialmente libre de material sólido insoluble en agua, es decir, la cantidad de material insoluble en agua es inferior a 5.000 ppm, en particular, menos de 100 ppm, en base a la L-alanina contenida en el mismo, o como máximo 1.000 ppm, en particular como máximo 20 ppm, en base al peso de la solución acuosa. En particular, la solución acuosa proporcionada en el paso a) se ha sometido a una filtración, en particular a una microfiltración o ultrafiltración, antes de someterla a la cristalización del paso b).

En una realización particular, la solución acuosa de L-alanina proporcionada en el paso a) se ha sometido a una decoloración con el fin de eliminar las impurezas que forman el color. La coloración se puede lograr mediante el tratamiento de la solución acuosa con carbón vegetal.

La concentración de L-alanina en la solución acuosa proporcionada en el paso a) puede variar habitualmente de 50 a 270 g/l, dependiendo de la temperatura de la solución acuosa. Con frecuencia, se proporciona primero una solución diluida que tiene una concentración en el intervalo de 50 a 150 g/l, que se somete a un paso de concentración, por ejemplo por evaporación de agua, a una concentración en el intervalo de 130 a 270 g/l, en particular de 160 a 230 g/l o de 170 a 210 g/l.

La evaporación de agua en el paso de concentración puede lograrse mediante evaporadores convencionales tales como evaporadores de circulación forzada, evaporadores de circulación natural, evaporadores de circulación forzada fresca, evaporadores de película delgada, evaporador de película descendente y evaporadores de tubo helicoidal. Los evaporadores se pueden calentar con medios de calentamiento convencionales tales como aceites de calefacción o vapor de calentamiento, que incluyen vapor de una red de vapor o vapor proporcionado en el proceso de la presente invención por recompresión de vapor. Preferiblemente, la evaporación de agua en el paso de concentración se logra por medio de un evaporador de película descendente, preferiblemente usando vapor de calentamiento obtenido por recompresión mecánica de vapor. La recompresión mecánica de vapor permite reducir la cantidad requerida de vapor fresco, reduciendo así los costes generales. La recompresión de vapor se logra preferiblemente mediante uno o más compresores rotativos. Debido a la carrera de compresión moderada de la recompresión de vapor y, por lo tanto, al aumento de temperatura limitado en la sección de calentamiento, se usan preferentemente evaporadores de película descendente, ya que pueden funcionar a un gradiente de temperatura pequeño. El evaporador de película descendente permite una alta tasa de evaporación a tasas de circulación pequeñas y bajas caídas de presión. Por lo tanto, los evaporadores de película descendente permiten tiempos de residencia cortos de la L-alanina sensible a la temperatura. Además, la baja caída de presión de los evaporadores de película descendente es beneficiosa para la recompresión de vapor y, por lo tanto, para la recuperación de calor. Es beneficioso conectar varios evaporadores en serie, ya que esto permite mantener alta la diferencia de temperatura entre el lado de calentamiento y el lado del proceso, lo que permite pequeñas superficies en el intercambiador de calor.

Las condiciones de supersaturación controlada se inducen en una suspensión acuosa de L-alanina. En la suspensión acuosa, el contenido de sólidos está preferiblemente en el intervalo de 5 a 35 % en peso, en particular de 15 a 30 % en peso y especialmente de 20 a 25 % en peso, en base al peso total de la suspensión.

Preferiblemente, la concentración de L-alanina disuelta en la suspensión acuosa de L-alanina bajo las condiciones de supersaturación está preferiblemente en el intervalo de 150 a 400 g/l, en particular de 170 a 340 g/l y especialmente de 180 a 300 g/l.

Preferiblemente, la supersaturación controlada se induce a una temperatura elevada, por ejemplo a una temperatura de al menos 30 °C, con frecuencia al menos 50 °C, en particular al menos 60 °C. En general, la temperatura no superará los 110 °C. En particular, la supersaturación se induce a una temperatura de 60 a 105 °C.

La supersaturación controlada puede inducirse mediante cualquier medida que disminuya la solubilidad de L-alanina en agua o aumente la concentración de L-alanina en la solución o suspensión acuosa a partir de la cual se cristaliza la L-alanina. Tales medidas incluyen la eliminación de agua, la adición de un antisolvente, como la acetona, o el enfriamiento o una combinación de estas medidas. Las medidas se eligen de manera que la proporción c: c* de la concentración c de L-alanina disuelta en la solución o suspensión acuosa para la solubilidad en equilibrio c* de L-alanina sea de> 1:1 a 1,5:1, frecuentemente de > 1:1 a 1,3:1, en particular de > 1:1 a 1,15:1, especialmente de> 1:1 a 1,10:1. La concentración de equilibrio c* de L-alanina en agua a una temperatura o presión dada es conocida o puede ser determinada por experimentos de rutina. La concentración real de L-alanina disuelta en la suspensión o solución se puede calcular utilizando la concentración de L-alanina en la solución acuosa, la cantidad de L-alanina alimentada al aparato de cristalización, la cantidad de agua eliminada y la cantidad de L-cristalizada. alanina. La concentración real también puede determinarse experimentalmente, por ejemplo por ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy).

Con respecto a la proporción c: c*, el valor de > 1:1 indica cualquier valor que exceda el estado del equilibrio termodinámico, es decir, el estado donde la proporción c: c* es 1. El valor de> 1 : 1 indica, por ejemplo un valor de 1,00001:1, 1,0005:1, 1,0001:1, 1,0005:1, 1,001:1 o 1,0002:1 , en particular un valor en el intervalo de 1,00001 a 1,002:1.

Preferiblemente, la supersaturación se induce o se mantiene eliminando agua de la solución o suspensión acuosa a partir de la cual se cristaliza la L-alanina o enfriando la solución o suspensión acuosa o mediante una combinación de estos procedimientos. Para lograr o mantener las condiciones de supersaturación, el agua se elimina preferiblemente por evaporación. En particular, las condiciones de supersaturación son inducidas o mantenidas por evaporación de agua o por evaporación/enfriamiento combinados.

Preferiblemente, la cristalización de L-alanina se realiza a presión reducida con el fin de facilitar la eliminación de agua por evaporación. Preferiblemente, la cristalización de L-alanina se realiza a una presión en el intervalo de 20 a 1.000 mbar, en particular de 70 a 500 mbar y especialmente de 120 a 310 mbar.

La cristalización de L-alanina puede realizarse en cualquier tipo de aparato de cristalización, que puede utilizarse para la cristalización de un compuesto orgánico a partir de una solución acuosa y que puede operarse de forma continua. Los aparatos de cristalización adecuados incluyen pero no se limitan a cristalizadores de tanque agitados, cristalizadores de tanque agitados con tubería de guía, cristalizadores de tanque agitados con tubería de guía y opcionalmente con medios para la clasificación de los cristales, denominados cristalizadores de tubo de corriente de aire o cristalizadores con deflectores de tubo de extracción (DTB), cristalizadores de circulación forzada que tienen

opcionalmente medios para la clasificación de cristales, tales como cristalizadores de tipo Oslo, cristalizadores de circulación forzada inducidos que tienen opcionalmente medios para la clasificación de cristales y cristalizadores de placas de enfriamiento. Los cristalizadores preferidos se seleccionan del grupo de cristalizadores de circulación forzada, cristalizadores de tubo de extracción, cristalizadores con deflectores de tubo de extracción, cristalizadores de tipo Oslo y cristalizadores de circulación forzada inducida, con particular preferencia a cristalizadores con deflectores de tubo de extracción y cristalizadores de circulación forzada inducida.

El procedimiento de la invención se realiza en continuo.

Como se indicó, el procedimiento de la invención se realiza en continuo, es decir, la solución acuosa de L-alanina proporcionada en el paso a) se alimenta a un aparato de cristalización operado en continuo. En otras palabras, la solución acuosa de L-alanina se alimenta en continuo a un aparato de cristalización operado en continuo y la L-alanina cristalizada se descarga en continuo desde el aparato de cristalización.

En el aparato de cristalización operado en continuo, se mantienen las condiciones de supersaturación controlada. Preferiblemente, las condiciones de supersaturación controlada se mantienen eliminando cantidades definidas de agua, preferiblemente mediante evaporación, o mediante enfriamiento o mediante combinaciones de estas medidas. Preferiblemente, el agua se elimina en continuo por evaporación.

Frecuentemente, el aparato de cristalización operado en continuo se opera de tal manera que las condiciones de supersaturación controlada son casi estáticas o casi cuasiestáticas. En particular, las variaciones de temperatura son inferiores a 10 K y/o las variaciones de presión son inferiores a 60 mbar.

Generalmente, el aparato de cristalización operado en continuo contiene una suspensión acuosa de cristales de L-alanina. Preferiblemente, el contenido sólido de la suspensión acuosa contenida en el aparato de cristalización operado en continuo está en el intervalo de 5 a 35 % en peso, en particular de 15 a 30 % en peso, especialmente de 20 a 25 % en peso, en base al peso total de la suspensión contenida en el aparato de cristalización operado en continuo o en el volumen activo del aparato de cristalización operado en continuo. El volumen activo se entiende como aquellas partes del aparato de cristalización, en el que se produce la cristalización, por ejemplo aquellas partes que contienen la suspensión acuosa que fluye libremente de cristales de L-alanina.

Frecuentemente, el paso b) del aparato de cristalización operado en continuo comprende los siguientes subpasos:

b1) alimentar en continuo la solución acuosa de Lalanine a un aparato de cristalización operado en continuo que contiene una suspensión acuosa de L-alanina, que preferiblemente tiene un contenido sólido de 5 a 30 % en peso, en particular de 20 a 25 % en peso, en base al peso de la suspensión;
b2) eliminar en continuo agua de la suspensión acuosa de L-alanina contenida en el aparato de cristalización, preferiblemente por evaporación, en particular por evaporación bajo presión reducida;
b3) eliminar en continuo la suspensión acuosa de L-alanina del aparato de cristalización.

Se ha encontrado beneficioso, si la corriente de la suspensión acuosa de L-alanina eliminada del cristalizador en el paso b3) se divide en dos corrientes. Una primera corriente se somete a un aislamiento de L-alanina sólida, mientras que el resto se realimenta al aparato de cristalización junto con una solución acuosa fresca de L-alanina, proporcionada en el paso b1). Para esto, una porción de la suspensión acuosa de L-alanina eliminada en el paso b3) se mezcla con la solución acuosa de L-alanina de el paso b1) antes de alimentar al aparato de cristalización. La mezcla así obtenida se retroalimenta luego al aparato de cristalización. La proporción de volumen de la corriente total eliminada del cristalizador en el paso b3) a la primera corriente que se somete a un aislamiento de L-alanina sólida es al menos 4:1, en particular al menos 7:1, más particularmente al menos 10:1, por ejemplo de 4:1 a 200:1, o de 7:1 a 80:1 o de 10:1 a 60:1.

Con el fin de eliminar el agua por evaporación, la energía necesaria para la evaporación debe introducirse en el cristalizador. Esto puede lograrse mediante elementos de calentamiento convencionales. Preferiblemente, el calor de evaporación se introduce en el cristalizador alimentando una corriente calentada de la solución acuosa de L-alanina al reactor. La corriente calentada de la solución acuosa de L-alanina que se alimenta al reactor se puede calentar mediante cualquier intercambiador de calor convencional. El intercambiador de calor puede funcionar con medios de calentamiento convencionales tales como aceites de calentamiento o vapor de calentamiento, que incluye vapor de una red de vapor o vapor proporcionado en el proceso de la presente invención por recompresión de vapor de agua evaporada durante la cristalización o concentración de la solución acuosa de L-alanina . Preferiblemente, la solución calentada de L-alanina, que se alimenta al cristalizador, se calienta usando un evaporador de descompresión de circulación forzada, que se calienta preferiblemente mediante vapor a partir de la recompresión de vapor del agua evaporada durante la cristalización o concentración de la solución acuosa de L-alanina. El uso de un evaporador de descompresión de circulación forzada minimiza las incrustaciones en las superficies del intercambiador de calor.

El aparato de cristalización operado en continuo es preferiblemente un cristalizador de tubo de extracción, un cristalizador con deflectores de tubo de extracción o un cristalizador de circulación forzada inducida.

En el paso c), la L-alanina cristalizada se separa del licor madre acuoso. Para esto, la suspensión de L-alanina cristalizada en el licor madre acuoso se somete a separación sólido/líquido. Las medidas adecuadas para la separación de sólidos de líquidos incluyen centrifugación, filtración o torres de lavado. Los medios para la centrifugación pueden incluir, pero no están limitados a, centrífugas de empuje, centrífugas de criba de gusano, centrifugadoras peladoras y decantadores. Los medios para la filtración pueden incluir, pero no están limitados a, filtros de presión rotativos, filtros de correa, filtros de succión, filtros de cámara y prensas de filtro de cámara. Las torres de lavado adecuadas pueden incluir, pero no están limitadas a, columnas de lavado por gravedad, columnas de lavado mecánico, columnas de lavado hidráulico y columnas de lavado de tipo pistón. Preferiblemente, la separación sólido/líquido se realiza por centrifugación, en particular utilizando una centrífuga de empuje o una centrífuga de criba de gusano, porque de ese modo se puede lograr una humedad residual baja en el sólido obtenido, que frecuentemente es menos del 10 % en peso, por ejemplo de 1 a 8 % en peso.

La separación sólido/líquido se puede realizar por etapas o preferiblemente se realiza en continuo.

El sólido obtenido puede lavarse para eliminar el licor madre adherente, por ejemplo mediante un solvente frío tal como agua o una solución acuosa saturada de L-alanina pura. Un solvente adecuado, que puede usarse para el lavado de L-alanina sólida, también puede ser un licor madre de un paso de cristalización posterior, si la cristalización se realiza en más de una etapa de cristalización. Preferiblemente, el lavado se realiza a una temperatura inferior a 25 °C, por ejemplo de 0 a 20 °C. El lavado puede ser realizado, por ejemplo atomizando la L-alanina cristalina sólida con el solvente frío seguido de una separación líquido/sólido adicional o suspendiendo L-alanina cristalina sólida en el solvente frío seguido de una separación adicional líquido/sólido. El lavado puede realizarse en un solo paso o mediante múltiples etapas de lavado, por ejemplo por 2, 3 o más pasos. Si el lavado se realiza mediante múltiples pasos de lavado, los pasos de lavado pueden operarse simultáneamente o preferiblemente en contracorriente.

Preferiblemente, la cristalización de L-alanina comprende al menos dos, en particular al menos 3 pasos o etapas de cristalización posteriores. De este modo, se obtienen cristales más compactos de L-alanina, que tienen una baja proporción de aspecto. Además, la L-alanina cristalina obtenida en un segundo o tercer paso de cristalización tiene un tamaño de partícula más grande.

En un procedimiento de cristalización de múltiples etapas, la solución acuosa de L-alanina proporcionada en el paso a) se alimenta a una etapa (1) de cristalización, que se opera por lotes o funciona preferiblemente de forma continua como se divulgo anteriormente. La L-alanina cristalina obtenida en esta etapa (1) se disuelve luego en agua y la solución obtenida se somete a un paso (2) de cristalización posterior, en el que se obtiene una L-alanina cristalina purificada y un licor madre adicional. Preferiblemente, el licor madre del paso (2) de cristalización posterior se mezcla con agua y la mezcla se usa para disolver la L-alanina cristalina obtenida en el paso (1) de cristalización. La L-alanina cristalina obtenida en la etapa (2) puede someterse a uno o más, por ejemplo a 1 o 2 etapas (3) y (4) de cristalización adicionales, respectivamente. Preferiblemente, el licor madre del paso (n + 1) de cristalización posterior se mezcla con agua y esta mezcla se usa para disolver la L-alanina cristalina obtenida en el paso de cristalización (n), en el que n indica el paso de cristalización respectiva. El licor madre de la primera etapa de cristalización puede desecharse o someterse a otra etapa de cristalización para obtener un licor residual, que se desecha, y la L-alanina cristalina de menor pureza. La L-alanina cristalina obtenida en dicha etapa de cristalización puede disolverse, por ejemplo en la solución acuosa de L-alanina proporcionada en la etapa a) para obtener una solución más concentrada, que se alimenta en el paso (1) de cristalización. La L-alanina cristalina impura obtenida en dicha etapa de cristalización también puede disolverse en una mezcla de agua y el licor madre obtenido en el paso (1) de cristalización y combinarse con la solución acuosa de L-alanina proporcionada en el paso a) para obtener una solución concentrada, que se alimenta en el paso (1) de cristalización.

De acuerdo con la invención, al menos la etapa (1) de cristalización se realiza de acuerdo con el procedimiento divulgado anteriormente, que implica la cristalización bajo condiciones de supersaturación controlada. Preferiblemente, también la etapa (2) de cristalización se realiza de acuerdo con el procedimiento divulgado anteriormente, que implica la cristalización bajo condiciones de supersaturación controlada.

El proceso de acuerdo con la invención se divulga en detalle a continuación con referencia a las figuras 1 a 6. Las figuras mostradas sirven para ilustración y no están destinadas a restringir la invención a las mismas.

Descripción de las figuras

El proceso de acuerdo con la invención se divulga en detalle a continuación con referencia a las figuras 1 a 7. Las figuras mostradas sirven para ilustración y no están destinadas a restringir la invención a éstas.

La Figura 1 muestra un diagrama de flujo básico del proceso de acuerdo con la invención.

La Figura 2 muestra una realización de un cristalizador de circulación forzada.

La Figura 3 muestra otra realización de un cristalizador de circulación forzada, en este caso un cristalizador con deflectores de corriente de aire.

La Figura 4 muestra una realización del cristalizador de circulación forzada inducida.

La Figura 5 muestra un diagrama de bloque de una realización de un proceso de múltiples etapas de acuerdo con la invención.

La Figura 6 muestra un diagrama de bloque de una realización preferida de un proceso de múltiples etapas de acuerdo con la invención.

La Figura 7 muestra esquemáticamente una etapa de cristalización de acuerdo con la invención.

Figura 8 Microfotografía de cristales obtenidos a partir del experimento comparativo 1.

Figura 9 Microfotografía de cristales obtenidos del experimento comparativo 2.

Figura 10 Microfotografía de cristales obtenidos del ejemplo 1 de acuerdo con la invención.

En las figuras, se usan los siguientes símbolos de referencia:

C fase cristalina /cristales
CR cristalización
D descarga
F alimentación
L licor
ML licor madre
MLR licor madre reciclado
P producto
R suspensión reciclada
RL licor residual
S solución fresca
SLS separación sólido/líquido
V vapor
W vapor condensado (agua líquida)
WL líquido de lavado

i indexado para la etapa

1 cristalizador
2 intercambiadores de calor
3 separador
4 bomba de circulación
5 bomba de concentrado
6 compresor para vapor
10 entrada
11 extracción de pasta
12 salida de la suspensión
13 extracción/desbordamiento de líquidos
14 tubo de extracción
15 desempañador
16 salida de vapor
17 zona de asentamiento
18 agitador
19 inductor
20 zona de separación de vapor
21 volumen activo

Como se ilustra en la figura 1, se combina una corriente S fresca que contiene una solución acuosa de L-alanina con una corriente R de reciclaje y se calienta en un intercambiador 2 de calor a una temperatura de al menos 50 °C, por ejemplo en el intervalo de 60 °C a 105 °C, para dar una solución acuosa de L-alanina como corriente F de alimentación. El intercambiador 2 de calor puede disponerse horizontalmente o verticalmente dependiendo de los requisitos específicos. La alimentación F se alimenta entonces a un cristalizador 1 operado en continuo. El cristalizador 1 contiene como volumen activo una suspensión acuosa sobreaturada de L-alanina con un contenido de sólidos de 5 % a 30 % en peso, por ejemplo de 20 % a 25 % en peso, en base al peso de la suspensión. Al alimentar la solución acuosa subsaturada de L-alanina F en el volumen activo y eliminar el agua al mismo tiempo, se nivela la

concentración de L-alanina en la suspensión sobresaturada, es decir, en el volumen activo del cristalizador 1. La supersaturación controlada de L-alanina en la suspensión acuosa se efectúa a una temperatura de al menos 50 °C, por ejemplo en el intervalo de 60 °C a 105 °C, y a presión reducida, por ejemplo en el intervalo de desde 120 mbar a 800 mbar.

El agua se elimina de la suspensión acuosa de L-alanina por evaporación, el vapor de agua V se retira en la cabeza del cristalizador 1. El vapor V puede transportarse adicionalmente a través de un compresor 6 para calentar el intercambiador 2 de calor, conducido por ejemplo en contracorriente con la alimentación F que se va a calentar, y dejando el intercambiador 2 de calor como condensado W.

Se elimina una descarga D de la pasta que contiene L-alanina cristalina en el extremo inferior del cristalizador 1. De la descarga D, se toma una corriente parcial como corriente R de reciclado y se transporta a través de una bomba 4 de reciclado para mezclarla con la corriente S fresca antes, en o después de la entrada en el intercambiador 2 de calor. La descarga D se dividirá de tal forma que la proporción de masa de la corriente R de reciclado a la corriente S fresca sea preferiblemente mayor que 5, en particular mayor que 10, mayor que 20, por ejemplo en el intervalo de 40:1 a 60:1.

La otra parte de la descarga D se dirige por medio de una bomba 5 de concentrado a un separador 3. En el separador 3, la pasta D se separa para obtener el licor madre ML y la L-alanina cristalina como producto P. Si se desea, el licor madre ML se puede reciclar al proceso inventivo o a una etapa anterior.

Alternativamente, se elimina una descarga D de la pasta que contiene L-Alanina cristalina en el lado del extremo inferior del cristalizador 1. La descarga D se dirige por medio de una bomba 5 de concentrado a un separador 3. En el separador 3, la pasta D se separa para obtener el licor madre ML y la L-alanina cristalina como producto P. Si se desea, el licor madre ML puede reciclarse al proceso de la invención o a una etapa anterior. Se retira una segunda descarga como corriente R de reciclado en la parte central del extremo inferior del cristalizador 1. La corriente R de reciclado se transporta a través de una bomba 4 de reciclado para mezclarse con la corriente S fresca antes, en o después de entrar en el intercambiador 2 de calor. La proporción de masa de la corriente R de reciclado a la corriente S fresca es mayor que 5, en particular mayor que 10, mayor que 20, por ejemplo en el intervalo de 40:1 a 60:1. Esta extracción alternativa de dos pastas diferentes puede resultar particularmente ventajosa si la pasta D tomada en el lado del cristalizador es más gruesa o contiene cristales de una distribución de tamaños diferente que la pasta R tomada en la parte inferior del cristalizador 1.

La cristalización puede efectuarse preferiblemente en un cristalizador operado en continuo, por ejemplo un cristalizador de circulación forzada, un cristalizador de tubo de extracción o un cristalizador con deflectores de tubo de extracción, o en particular en un cristalizador de circulación forzada inducida.

La Figura 2 muestra un cristalizador de tubo de extracción. La solución acuosa sobrecalentada de L-alanina F se alimenta al cristalizador 1 a través de una entrada 10, fluye hacia arriba a través de un tubo 14 de extracción y vuelve hacia abajo a lo largo del lado exterior del tubo 14 de extracción.

El agua evaporada de la suspensión en el volumen 21 activo asciende como vapor V a la cabeza del cristalizador 1. El vapor V pasa una zona 20 de separación de vapor y un desempañador 15 para eliminar las gotas líquidas y deja el cristalizador 1 a través de una salida 16 de vapor. El vapor V se transporta adicionalmente a través de un compresor 6 para calentar el intercambiador 2 de calor, conducido por ejemplo, en contracorriente con la alimentación F que se va a calentar, y dejando el intercambiador 2 de calor como condensado W.

Alrededor del volumen 21 activo, puede disponerse una zona 17 de sedimentación. A través de una salida 12 de suspensión en la región inferior del volumen 21 activo, se retira la suspensión R y se combina con la solución S fresca. La corriente de R y S combinada se recicla mediante una bomba 4 de circulación a través de un intercambiador 2 de calor como alimentación F al cristalizador. La bomba 4 de circulación proporciona la agitación necesaria de la suspensión mezclada con la solución F entrante y efectúa la circulación de la suspensión dentro del volumen 21 activo.

A través de una pasta 11 extraída situada en el fondo del cristalizador 1 por debajo del volumen 21 activo, la pasta D se retira del cristalizador 1. La pasta D extraída contiene la L-alanina cristalina deseada.

La Figura 3 muestra un cristalizador con deflectores de tubo de extracción con circulación forzada. La solución acuosa supercalentada de L-alanina F se alimenta al cristalizador 1 a través de una entrada 10, fluye hacia arriba a través de un tubo 14 de extracción y vuelve hacia abajo a lo largo del lado exterior del tubo 14 de extracción. Un agitador 18 de entrada de fondo proporciona la agitación necesaria de la suspensión mezclada con la solución F entrante con un consumo de energía moderado y efectúa la circulación de la suspensión dentro del volumen 21 activo.

El agua evaporada de la suspensión en el volumen 21 activo asciende como vapor V a la cabeza del cristalizador 1. El vapor V pasa una zona de separación 20 de vapor y un desempañador 15 para eliminar las gotas líquidas y deja

el cristalizador 1 a través de un vapor salida 16.

Periférico al volumen 21 activo, una zona 17 de sedimentación está dispuesta por medio de deflectores. En la zona 17 de sedimentación, se puede extraer el exceso de licor madre L y/o partículas finas para su posterior procesamiento en un desbordamiento 13 en la región superior de la zona 17 de sedimentación. Este licor L básicamente transparente puede reciclarse al proceso para regular la temperatura y/o la concentración de la solución de L-alanina en cualquier etapa.

A través de una salida 12 de suspensión en la región inferior de la zona 12 de sedimentación, se retira la suspensión R y se recicla para mezclarla con la corriente S de alimentación fresca.

A través de una pasta 11 extraída situada debajo de la zona 12 de sedimentación, la pasta D se retira del cristalizador 1. La pasta D extraída contiene la L-alanina cristalina deseada como producto P.

El cristalizador de circulación forzada inducida que se muestra en la figura 4 funciona de manera similar a los cristalizadores de circulación forzada mostrados en las figuras 2 y 3 como se explicó anteriormente. A diferencia de la realización que se muestra en la figura 3, el cristalizador de circulación forzada inducida funciona sin ningún dispositivo de agitación interna.

La solución acuosa supercalentada de L-alanina F se alimenta al cristalizador 1 a través de una entrada 10, fluye hacia arriba a través de un tubo 14 de extracción y vuelve hacia abajo a lo largo del lado exterior del tubo 14 de extracción. Agua evaporada de la suspensión en el volumen 21 activo asciende como vapor V a la cabeza del cristalizador 1. El vapor V pasa una zona 20 de separación de vapor y un desempañador 15 para eliminar las gotas de líquido y sale del cristalizador 1 a través de una salida de vapor 16.

Periférico al volumen 21 activo, se dispone una zona 17 de sedimentación. El licor L se retira en una extracción 13 de líquido en la región superior de la zona 17 de sedimentación. Este licor L básicamente transparente se recicla a través de la bomba 4 de circulación. A través de una salida 12 de suspensión por debajo de la zona 12 de sedimentación, se retira la suspensión R y se combina con el licor L claro en un circuito externo. La solución S fresca se alimenta a la corriente L reciclada antes, simultáneamente o después de la combinación con la corriente R. La corriente reciclada combinada se calienta en un intercambiador de calor (no mostrado en la figura) y se alimenta al cristalizador 1 como alimentación F. Análogamente a la realización mostrada en la figura 2, el vapor V puede usarse para calentar el intercambiador 2 de calor.

El rendimiento de la bomba 4 de circulación proporciona la extracción con sifón de la suspensión R reciclada y la agitación necesaria de la suspensión dentro del volumen 21 activo. No se requieren más dispositivos de agitación, de modo que los cristales en la suspensión se tratan con la menor tensión posible.

A través de una pasta 11 extraída situada en el fondo del cristalizador 1 debajo del volumen 21 activo y debajo de la zona 12 de sedimentación, la pasta D se retira del cristalizador 1. La pasta D extraída contiene la L-alanina cristalina deseada como producto P .

En el proceso de múltiples etapas de acuerdo con la figura 5, la cristalización se realiza en n etapas. Se introduce una alimentación F en una primera etapa de cristalización (i = 1). El solvente se elimina por la primera cristalización, por ejemplo a modo de evaporación. La suspensión se separa en licor residual RL y una primera fase cristalina C_1. La primera fase cristalina C_1 se pasa a una segunda etapa de cristalización (i = 2). El licor madre de la segunda etapa de cristalización (i = 2) se recicla en la primera etapa de cristalización (i = 1), por ejemplo mezclándolo con agua y usando la mezcla para disolver la fase cristalina C_1 obtenida en la primera etapa de cristalización. En cada etapa de cristalización (i = 2 a n), se elimina agua, por ejemplo retirándola en la forma de vapor V solvente y la suspensión se separa en licor madre ML y una fase cristalina C. La fase cristalina de cada etapa de cristalización (i) se pasa a la siguiente etapa de cristalización (i + 1). El licor madre de cada etapa de cristalización (i) se recicla en la etapa de cristalización previa (i-1), por ejemplo mezclándolo con agua y utilizando la mezcla para disolver la L-alanina cristalina desde la etapa de cristalización previa. Una fase cristalina que contiene los cristales de L-alanina deseados se retira de la última etapa n. El número de etapas n depende de la calidad deseada de los cristales con respecto a la forma, la pureza, las características de flujo y las propiedades de almacenamiento.

En el proceso de múltiples etapas de acuerdo con la figura 6, la cristalización se realiza en n etapas, siendo la primera etapa (i = 1) una sección de separación. El flujo es similar al flujo divulgado en la figura 4, pero la alimentación F se introduce entre la etapa de separación (i = 1) y la segunda etapa de cristalización (i = 2). En general, el proceso de acuerdo con la figura 6 proporciona mayores rendimientos del producto deseado.

Una etapa (i) de cristalización de acuerdo con la figura 7 comprende un aparato para cada uno de la cristalización CR_i y la separación sólido/líquido SLS_i. Los aparatos empleados para la cristalización CRi son en general cristalizadores adecuados para suspensiones cristalinas tales como reactores de tanque agitados, por ejemplo cristalizadores de tipo Swenson, cristalizadores de circulación forzada, por ejemplo reactores de tipo Oslo, reactores de tubo de extracción, cristalizador con deflectores de tubo de extracción (véase figura 3) o cristalizador de

circulación forzada inducida (véase la figura 4). Los aparatos empleados para la separación sólido/líquido SLS_i son en general centrífugas, decantadores, filtros, filtros prensadores o torres de lavado.

La alimentación F_i para cada etapa (i) comprende suspensión que contiene la fase cristalina C_{i-1} de la etapa previa (i-1) y/o la alimentación F fresca, respectivamente, así como el licor madre reciclado MLR_i. El destilado se retira de la cristalización CR_i en la forma de vapor de solvente V_i. Posteriormente, la suspensión se separa en la separación sólido/líquido SLS_i en el licor madre ML_i y una fase cristalina C_i. La fase cristalina C_i de cada etapa de cristalización (i) puede pasarse como alimentación Fi+1 a la siguiente etapa de cristalización (i+1) o retirarse como producto, respectivamente. Una parte de licor madre ML_i de cada etapa de cristalización (i) se recicla en la misma etapa que MLR_i. El resto de licor madre ML_i de cada etapa de cristalización (i) puede reciclarse en la etapa de cristalización previa (i-1) o retirarse, respectivamente.

Para mejorar la pureza del producto L-alanina, el líquido de lavado WL_i puede emplearse adicionalmente en la separación sólido/líquido SLS_i. Como líquido de lavado WL_i se usa preferiblemente agua fría o licor madre frio de una etapa de cristalización posterior (i + 1).

Experimento comparativo 1:

El experimento se realizó en un recipiente con doble chaqueta de 1 litro, equipado con un agitador de paletas y 3 deflectores. Se añadió una solución al 19.5 % en peso de L-alanina pura en agua desionizada al recipiente y se sembró con 0.5 % en peso, en base a la masa de la solución de alanina, de L-alanina cristalina. El recipiente se calentó a 60 °C con agitación a 600 min^{-1} y la presión se redujo lentamente a 170 mbar, eliminando así el agua por evaporación hasta que la cantidad de agua evaporada fue 45 % en peso de la solución de alanina inicial. De este modo, se obtuvo L-alanina sólida como cristales compactos en forma de barra como se puede ver en la figura 8.

Experimento comparativo 2:

El experimento se realizó como se divulga para el experimento comparativo 1, con la excepción de que la solución de alanina inicial contenía un 0,1 % en peso de L-valina. De este modo, se obtuvo L-alanina sólida como cristales en forma de aguja como se puede ver en la figura 9.

Ejemplo 1 (de acuerdo con la invención):

El experimento se realizó en un recipiente con doble chaqueta de 1 litro como se divulga para el experimento comparativo 1. El recipiente se conectó con una línea de alimentación y un amortiguador de producto para la eliminación de la suspensión. El recipiente se opero en continuo como un cristalizador de MSMPR (suspensión mixta de producto mixto de eliminación). Una solución de L-alanina obtenida de una fermentación que tiene una concentración de 17,8 % de L-alanina, 0,085 % en peso de L-valina y 0.35 % de impurezas orgánicas diferentes de L-valina fue alimentada en continuo al recipiente con una tasa de alimentación de 1.040 g/h. El recipiente contenía una suspensión acuosa al 20 % en peso de L-alanina cristalina y se hizo funcionar a 60 °C y 180 mbar con una velocidad de agitación de 600 min-1. El flujo volumétrico de circulación en el recipiente fue 0,00273 m^3/s. El agua se eliminó en continuo por evaporación de manera que el grado de evaporación, es decir, el flujo relativo de agua evaporada en base al flujo de alimentación, fue 50 %. Bajo estas condiciones, el grado de supersaturación, es decir, la proporción c/c* fue de aproximadamente 1,00005. Mediante este proceso, la L-alanina cristalina sólida se obtuvo como barras compactas como se puede ver en la figura 10.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de L-alanina cristalina a partir de una solución acuosa de L-alanina que contiene al menos 100 ppm, en base a L-alanina, de uno o más α-aminoácidos diferentes de L-alanina, comprendiendo el procedimiento

a) proporcionar una solución acuosa de L-alanina que contiene al menos 100 ppm, en base a L-alanina, de uno o más α-aminoácidos diferentes de L-alanina;
b) someter la solución de L-alanina a una cristalización induciendo condiciones de supersaturación controlada de manera tal que la proporción c:c* de la concentración c de L-alanina disuelta a la solubilidad en equilibrio c* de L-alanina bajo las condiciones de supersaturación controlada son de> 1:1 a 1,5:1, lo que afecta la cristalización de L-alanina; y
c) separar L-alanina cristalina del licor madre.

en el que la solución acuosa de L-alanina se alimenta a un aparato de cristalización operado en continuo, que contiene una suspensión acuosa de cristales de L-alanina.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la concentración de L-alanina disuelta bajo las condiciones de supersaturación es de 150 a 400 g/l.

3. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la supersaturación controlada se induce a una temperatura de al menos 30 °C.

4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la supersaturación controlada se induce mediante la eliminación de agua y/o por enfriamiento.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el agua se elimina por evaporación.

6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paso b) comprende

b1) alimentar en continuo la solución acuosa de L-alanina a un aparato de cristalización que contiene una suspensión acuosa de L-alanina;
b2) eliminar en continuo agua de la suspensión acuosa de L-alanina contenida en el aparato de cristalización para mantener las condiciones de supersaturación controlada;
b3) eliminar en continuo la suspensión acuosa de L-alanina del aparato de cristalización.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que una porción de la suspensión acuosa de L-alanina eliminada en el paso b3) se mezcla con la solución acuosa de L-alanina del paso b1) y la mezcla se retroalimenta al aparato de cristalización.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la proporción de masa de la mezcla que se retroalimenta al aparato de cristalización y la solución acuosa de L-alanina, mezclada con la suspensión, es al menos 4:1.

9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el contenido sólido de la suspensión acuosa es de 5 a 30 % en peso, en particular de 20 a 25 % en peso, en base al peso de la suspensión.

10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cristalización se efectúa en un cristalizador, seleccionado de un cristalizador de circulación forzada, cristalizador de tubo de extracción, cristalizador con deflector de tubos de extracción, un cristalizador de tipo Oslo y un cristalizador de circulación forzada inducida.

11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cristalización de L-alanina comprende al menos dos pasos de cristalización posteriores.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la L-alanina cristalina obtenida en un paso de cristalización precedente se disuelve en una mezcla del licor madre del paso de cristalización posterior con agua para obtener una solución acuosa de L-alanina, desde la cual la L-alanina se cristaliza en el siguiente paso de cristalización.

13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución acuosa de L-alanina proporcionada en el paso a) no contiene más de 100 ppm de material sólido insoluble.

14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la solución acuosa de L-alanina proporcionada en el paso a) se ha filtrado para eliminar el material sólido insoluble.

15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la solución acuosa de L-alanina proporcionada en el paso a) contiene al menos un aminoácido seleccionado de Dalanina, L-valina, L-leucina, L-lisina, L-asparagina, L-glutamina y L-arginina.

16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la solución acuosa de L-alanina proporcionada en el paso a) se obtiene mediante un proceso de fermentación.

Fig. 1:

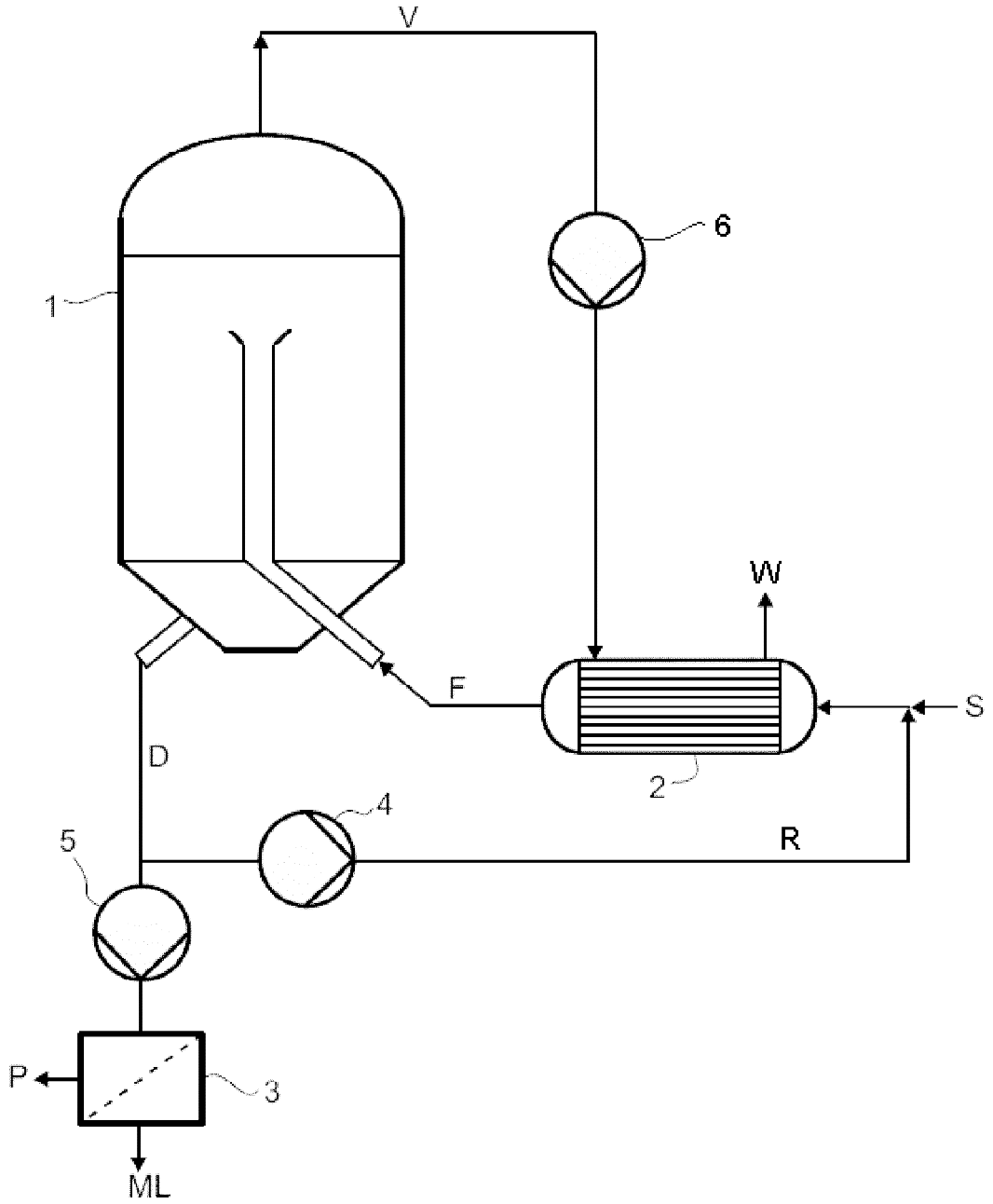

Fig. 2:

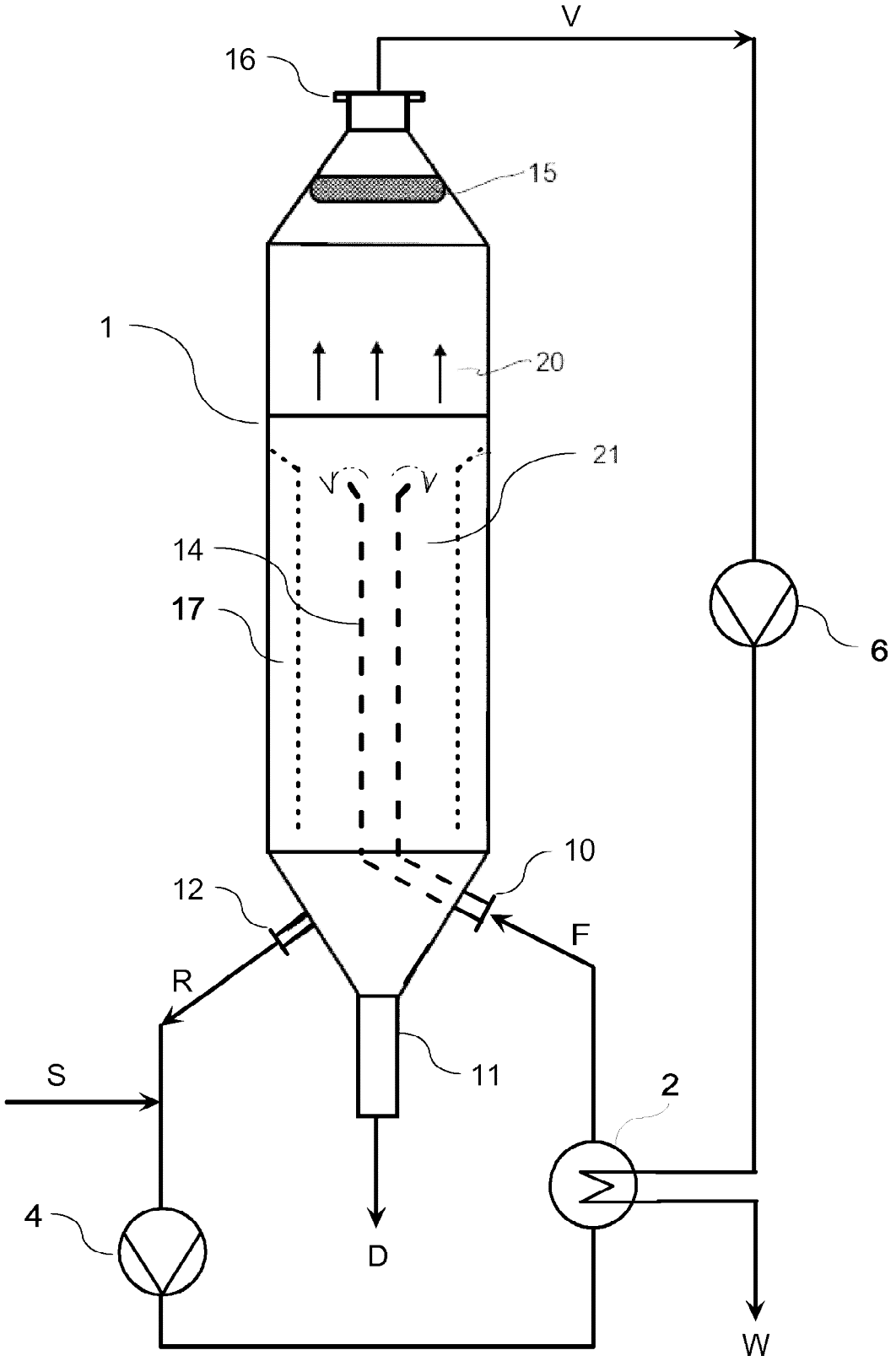

Fig. 3:

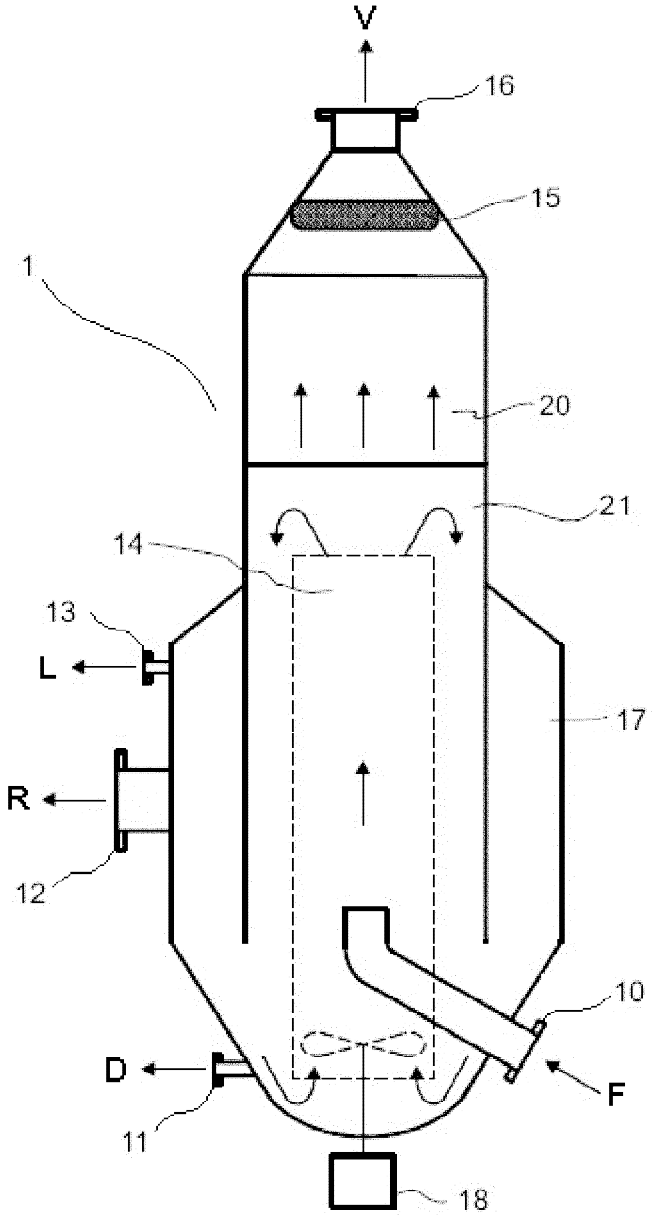

Fig. 4:

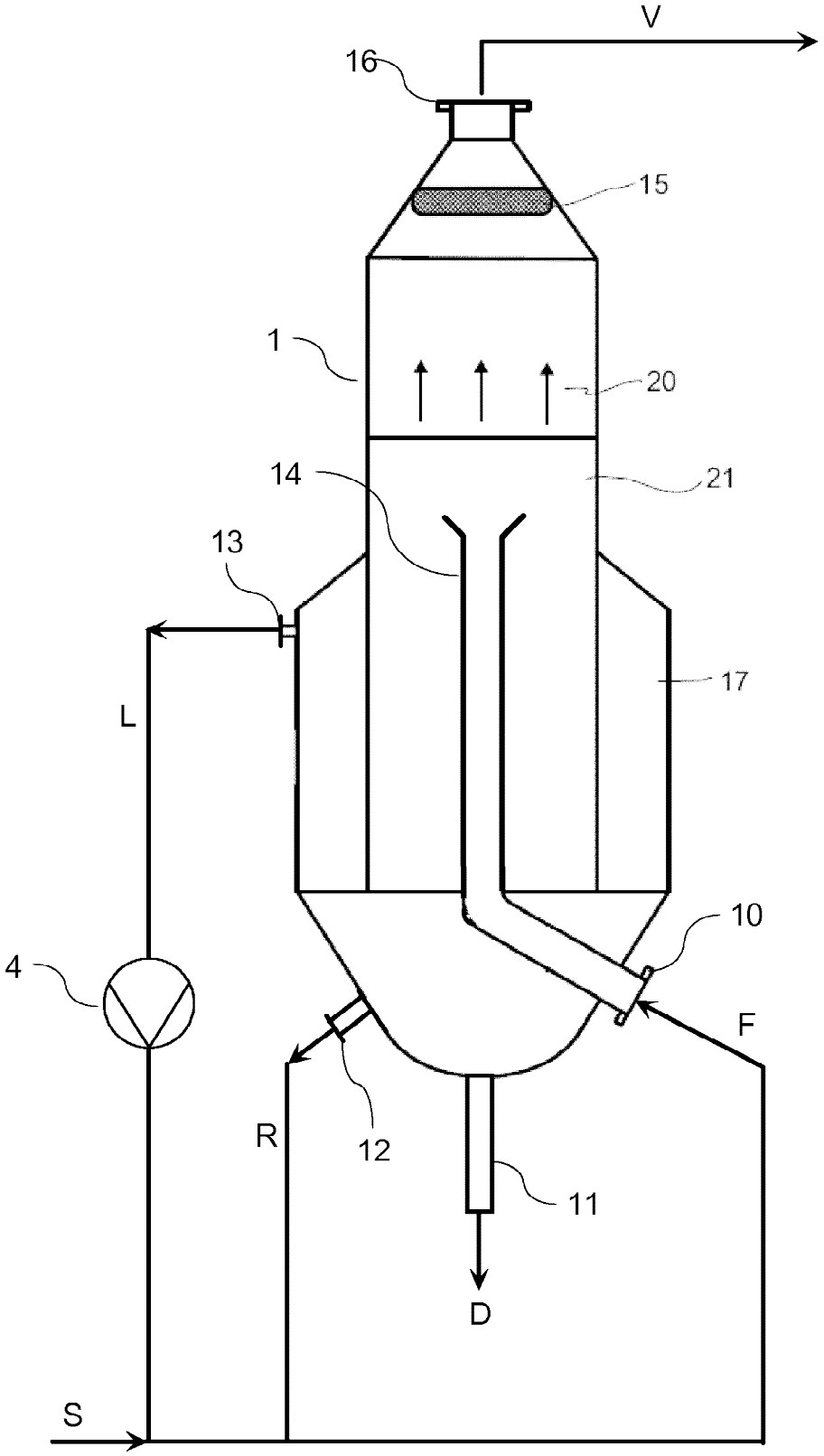

Fig. 5:

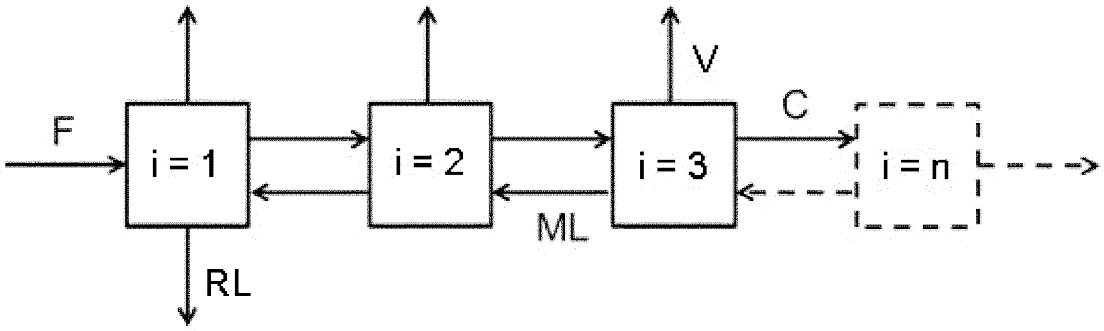

Fig. 6:

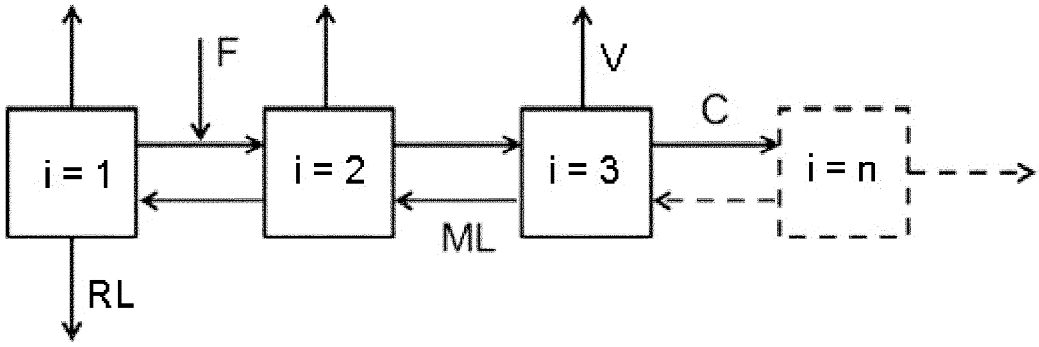

Fig. 7:

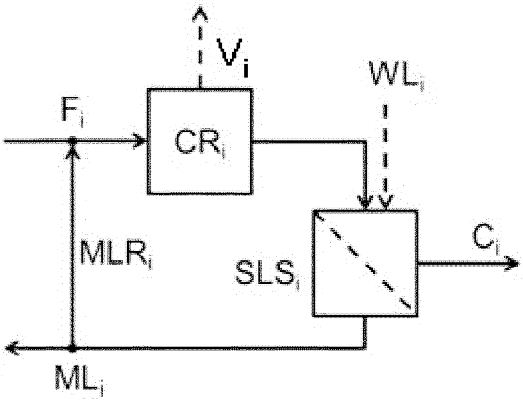

Fig. 8:

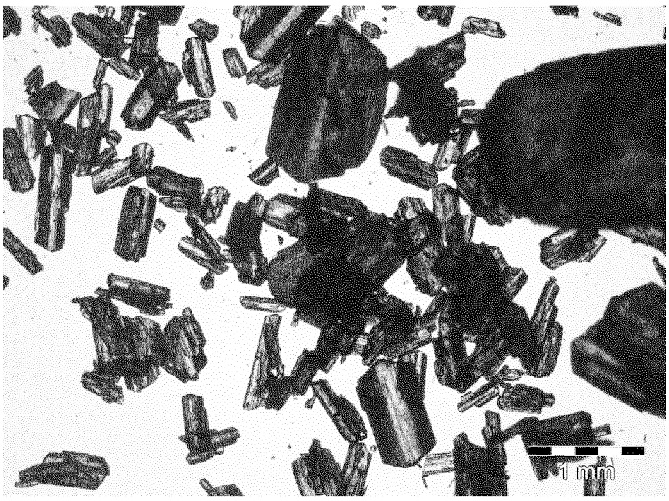

Fig. 9:

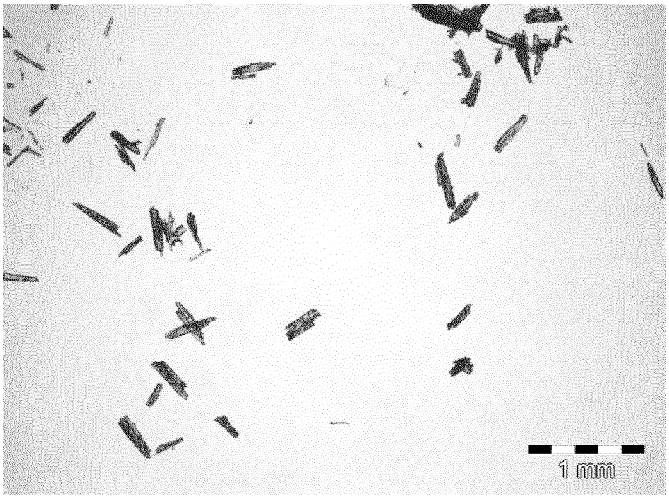
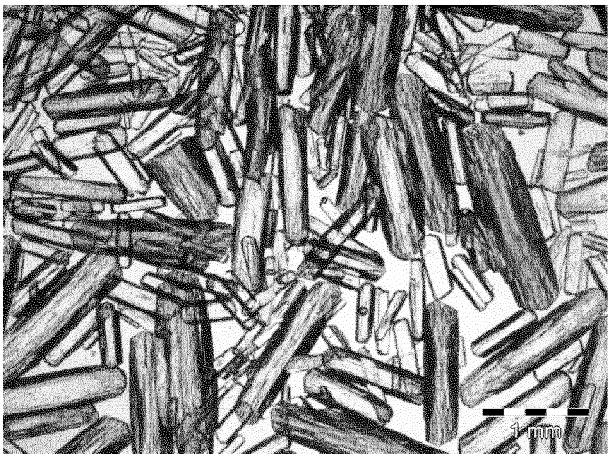
Fig. 10: