

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 403**

51 Int. Cl.:

B01D 15/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2013 PCT/NL2013/050897**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14092573**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2013 E 13812193 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 2931399**

54 Título: **Separación cromatográfica en lecho móvil simulado altamente productiva**

30 Prioridad:

12.12.2012 EP 12196658

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

11.11.2019

73 Titular/es:

**STICHTING WAGENINGEN RESEARCH (100.0%)
Droevendaalsesteeg 4
6708 PB Wageningen, NL**

72 Inventor/es:

**VROON, RONALD CORNELIS;
BOON, MONIEK AFRA y
BUSSMANN, PAULUS JOSEPHUS THEODORUS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 730 403 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

Separación cromatográfica en lecho móvil simulado altamente productiva

5 La invención se dirige a un proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado, y a un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado para llevar a cabo dicho proceso.

10 La tecnología de separación es muy importante en muchas industrias diferentes, lo que incluye la industria alimentaria. La separación de diversos componentes es a menudo crucial para obtener el producto deseado y/o eliminar componentes indeseables. En la industria alimentaria, por ejemplo, ocurre a menudo que una corriente de producto necesita purificarse de componentes indeseables, o que los ingredientes deseados necesitan recuperarse a partir de una corriente de proceso. Para dichas separaciones se han desarrollado muchas técnicas diferentes.

15 Una de las técnicas de separación bien conocida es la cromatografía, que se refiere a la separación de una mezcla mediante el uso de una fase móvil fluida, que transporta la mezcla a través de una estructura, la fase estacionaria. Los diversos componentes de la mezcla viajan a velocidades diferentes, lo que provoca que se separen. La separación se basa en la partición diferencial entre la fase móvil y la estacionaria. Las diferencias sutiles en el coeficiente de partición de un compuesto dan como resultado una retención diferencial sobre la fase estacionaria y, por lo tanto, cambian la separación.

20 Se conocen muchos tipos diferentes de cromatografía. Pueden clasificarse i) basada en la forma del lecho cromatográfico, tal como cromatografía en columna y cromatografía planar (lo que incluye cromatografía en papel y cromatografía en capa fina), ii) basada en el estado físico de la fase móvil, tal como cromatografía de gases y cromatografía líquida, iii) basada en el mecanismo de separación, tal como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de afinidad, o iv) basada en técnicas especiales, cromatografía bidimensional, cromatografía de lecho móvil simulado, cromatografía de gases por pirólisis, cromatografía líquida rápida de proteínas y cromatografía a contracorriente. Estos ejemplos, sin embargo, no deben considerarse necesariamente como excluyentes mutuamente.

25 Estos diversos tipos de técnicas de cromatografía tienen cada una sus propias ventajas y desventajas. Se ha encontrado que algunas técnicas son aplicables a escala de laboratorio o preparativa, mientras que otras técnicas se usan comúnmente en procesos de producción a gran escala.

30 En la industria alimentaria, hasta ahora se ha considerado como difícil escalar procesos de separación específicos (tales como el fraccionamiento por cromatografía de exclusión por tamaño y la cromatografía de adsorción), en particular cuando se implican mezclas específicas. Ejemplos de dichas mezclas incluyen mezclas de sal y proteínas (tales como sal y proteína de suero), mezclas de azúcar y proteínas (tales como lactosa y proteína láctea), mezclas de azúcar y sal (tales como lactosa y sal o sacarosa y sal), mezclas de oligosacáridos, mezclas de proteínas y jugos de frutas que contienen azúcares y ácidos. Si bien la separación de dichas mezclas con los procesos de separación cromatográfica mencionados anteriormente es posible a escala de laboratorio, el escalado de dichos procesos resulta en un equipamiento costoso (gasto de capital elevado, CAPEX), así como también en costos operativos considerables (gasto operativo elevado, OPEX). El equipamiento costoso, por ejemplo, se debe a la necesidad de una cantidad considerable de material de fase estacionaria. Dicho material es típicamente caro. Los costos operativos elevados se deben principalmente a una dilución del producto como resultado del uso considerable de eluyente para transportar la mezcla a través de la fase estacionaria.

35 Si bien en teoría, el escalado puede lograrse al mantener constante la altura del lecho e incrementar solo el diámetro de la columna, en la práctica esto requiere a menudo una reoptimización y una disminución de la tasa de flujo. Incluso si se fuera capaz de mantener igual la altura del lecho de la columna, existen desventajas adicionales, tales como el uso de un gran espacio y los problemas para lograr un empaquetamiento homogéneo de la columna y evitar la canalización.

40 Se han hecho algunos esfuerzos en la técnica para superar estos inconvenientes. Por ejemplo, mediante la reducción del tamaño de los sistemas existentes puede lograrse una reducción del CAPEX. Sin embargo, una condición previa para la reducción del tamaño es que la tasa de transferencia de masa se incremente. Estudios anteriores se han centrado en dicho aumento de la tasa de transferencia de masa mediante el uso de, por ejemplo, monolitos o partículas pequeñas relativamente como fase estacionaria.

45 50 55 Schulte y otros (Journal of Chromatography A 2001, 923 (1-2), 177-25) han descrito la cromatografía de lecho móvil simulado de la separación de diastereómeros mediante el uso de sorbentes monolíticos de sílice. De acuerdo con Schulte y otros, la capacidad de separación de un sistema de lecho móvil simulado depende de tres parámetros principales: la capacidad de saturación de la fase estacionaria, la resolución de picos (mediante la combinación de eficiencia y selectividad) y la caída de presión del sistema (en dependencia de la tasa de flujo de la fase móvil). Schulte y otros manifestaron que una separación dada en una determinada fase estacionaria con una capacidad de saturación optimizada puede mejorarse en términos de velocidad de fase móvil hasta que se alcanza la caída de presión máxima del sistema o la eficiencia del sorbente disminuye a tasas de flujo más altas debido a la influencia creciente de la difusión intrapartículas. Schulte y otros mencionaron que solo podría lograrse una velocidad lineal máxima limitada mediante el uso de materiales de sílice particulada estándar. Sin embargo, indicaron que las tasas de flujo de un sistema de lecho móvil simulado podrían aumentarse linealmente si pudiera superarse la caída de presión y el problema de eficiencia, lo que resultaría de esta

manera en una productividad mucho mayor. La solución presentada por Schulte y *otros* consistió en el uso de un sorbente monolítico de sílice. Podrían lograrse velocidades lineales altas debido a la baja caída de presión del sorbente monolítico de sílice en combinación con su alta eficiencia, incluso a tasas de flujo altas. Los materiales monolíticos, sin embargo, tienen algunas desventajas. Los monolitos se basan principalmente en polímeros orgánicos y en sílice. Los monolitos basados en polímeros orgánicos tienen típicamente una capacidad limitada debido a la ausencia de porosidad interna de la matriz. Los monolitos basados en sílice, por otro lado, tienen típicamente una estabilidad química baja lo que, a su vez, limita las condiciones de limpieza que se requieren, por ejemplo, en la industria alimentaria (pH alcalino a temperaturas elevadas). Además, existe una disponibilidad limitada de monolitos con respecto a la funcionalidad específica (tal como la (a) polaridad de la matriz, la distribución del tamaño de los poros) y el volumen (solo a escala analítica y preparativa), lo que hace que los monolitos sean muy caros para la aplicación a gran escala.

Gustavsson y *otros* (Journal of Chromatography A 2001, 925(1-2), 69-78) también describen que el uso de un lecho monolítico continuo es favorable en términos de su relación tasa de flujo/caída de presión. Gustavsson y *otros* describen el uso de un lecho de agarosa superporoso continuo, pero descubrieron un problema cuando se prepararon y se usaron lechos de gran diámetro para fines de cromatografía. Durante la preparación de dichos lechos de gran diámetro, las partes centrales solidificaron considerablemente más tarde que la parte externa, lo que resultó de esta manera en una distribución desigual del tamaño de los poros de flujo. Para evitar este problema, Gustavsson y *otros* investigaron la combinación de tecnología de columna de flujo radial y lechos superporosos continuos. Gustavsson y *otros* encontraron que esto permitía una mejora de la tasa de flujo a la vez que se mantenía una caída de presión relativamente baja.

El uso de una fase estacionaria particulada de tamaño pequeño se ha desalentado en la técnica anterior. Por ejemplo, Bidlingmaier y *otros* (Journal of Chromatography A 1999, 832 (1-2), 11-16) realizaron un estudio comparativo sobre el rendimiento de columna de una columna con una fase estacionaria particulada de 5 μm y una columna con una fase estacionaria monolítica de sílice. Aunque la eficiencia cromatográfica de ambas columnas fue aproximadamente la misma, la fase estacionaria monolítica proporcionó una caída de presión de tres a cinco veces menor. Esta caída de presión considerable ha desalentado a los científicos a investigar más a fondo el potencial de las fases estacionarias particuladas de tamaño pequeño.

El documento WO-A-2012/125313 describe un aparato de flujo radial modificado para adecuarse a la cromatografía de lecho móvil simulado. La fase líquida móvil se bombea en dirección radial a través de una fase estacionaria. La fase estacionaria se segmenta con entradas y salidas de corrientes de proceso (alimentación, eluyente, extracto y refinado) fijadas en ubicaciones específicas. Al intercambiar estas entradas y salidas a lo largo de los segmentos, se simula un movimiento de la fase estacionaria. El aparato descrito en el documento WO-A-2012/125313 tiene solo un dispositivo giratorio que se divide en múltiples segmentos. El documento WO-A-2012/125313 no describe una fase estacionaria particulada.

El documento US-A-5 433 847 describe un cromatógrafo de flujo radial en el cual el lecho se comprime apretadamente y se usa un absorbente con un diámetro de partícula, preferentemente, de menos de 100 μm . De acuerdo con este documento, el diámetro medio de partículas debe ser de menos de aproximadamente 0,05 veces la altura del cilindro (es decir, la dimensión del cilindro en la dirección axial). El documento US-A-5 433 847 enseña que un lecho más delgado (es decir, uno de menor altura) tiene un rendimiento superior al de un lecho más grueso. El documento US-A-5 433 847 no se relaciona con la tecnología de lecho móvil simulado.

Aún persiste la necesidad de mejoras en las técnicas de separación cromatográfica, en particular para aplicaciones a gran escala en la industria. Una necesidad particular es proporcionar una técnica de separación con una eficiencia de separación mejorada para permitir una reducción significativa en el tamaño del equipamiento. Las ventajas de esta reducción de escala son i) costo de inversión reducido (CAPEX), ii) posibilidades de aplicar fases estacionarias más costosas, e iii) implementación menos complicada dentro del proceso de producción (existente).

Un objeto de la invención es proporcionar un proceso de separación cromatográfica mejorada basado en una fase estacionaria particulada de tamaño pequeño, que supera una o más de las desventajas mencionadas anteriormente que se enfrentan en la técnica.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar un proceso de separación cromatográfica que combine tasas de flujo altas y eficiencias cromatográficas altas con una caída de presión pequeña.

Los inventores encontraron que uno o más de estos objetos pueden alcanzarse, al menos en parte, al combinar una fase estacionaria particulada de tamaño pequeño con una técnica de lecho móvil simulado en donde se aplican múltiples columnas de flujo radial.

En consecuencia, en un primer aspecto, la invención se dirige a un proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado, que comprende las etapas de aplicar una mezcla de alimentación y una fase móvil en la que dicha mezcla de alimentación es soluble, a un lecho móvil simulado que comprende una fase estacionaria particulada, y separar dicha mezcla de alimentación en un extracto y un refinado, en donde dicho lecho móvil simulado comprende múltiples columnas de flujo radial conectadas en serie en un bucle, y en donde la fase estacionaria particulada tiene un diámetro medio de partículas de 100 μm o menos.

La aplicación de una fase estacionaria particulada de tamaño pequeño reduce significativamente la resistencia a la transferencia de masa al acortar la longitud del recorrido para la transferencia de masa. La transferencia de masa mejorada da como resultado una eficiencia cromatográfica mejorada, porque los componentes se separan mejor. Como resultado, la longitud de la columna (y, en consecuencia, el volumen del equipamiento requerido) puede reducirse favorablemente. Como se sugiere en la técnica, el uso de una fase estacionaria particulada de tamaño pequeño produce un aumento en la caída de presión. Sin embargo, este efecto puede compensarse en gran medida por la eficiencia cromatográfica mejorada y la reducción resultante en la longitud de la columna. En una modalidad, se logra una capacidad volumétrica suficiente de acuerdo con la invención mediante la aplicación de columnas de flujo radial. En un diseño de columna de flujo radial, el flujo se dirige desde la periferia exterior de la columna en una dirección radial a través de un lecho de fase estacionaria anular hasta la salida de la columna. El área periférica de la columna forma un área de aplicación grande, que se combina con una altura pequeña del lecho (grosor radial del lecho). El escalado puede lograrse simplemente al hacer más alta la columna. Como resultado, se logran tasas de flujo altas y caídas de presión bajas. Sorprendentemente, y por el contrario a, por ejemplo, el dispositivo descrito en el documento US-A-5 433 847, esto no resulta o resulta apenas en una pérdida significativa de resolución en la separación cromatográfica.

Además, la dilución del producto como resultado del uso considerable de eluyente se limita en el proceso de la invención porque la separación cromatográfica se realiza en una configuración de lecho móvil simulado. Dicha configuración se beneficia de menos eluyente y menos resina en comparación con una configuración de cromatografía normal. El principio de la tecnología de lecho móvil simulado se representa esquemáticamente en la figura 1. Una mezcla de alimentación de dos componentes se separa en un refinado y un extracto mediante el uso de agua como eluyente. La fase móvil fluye en una dirección en el sentido de las manecillas del reloj a través de diversas columnas (ocho en la modalidad de la figura 1). El refinado contiene el componente que tiene una interacción más débil con la fase estacionaria, mientras que el extracto contiene el componente que tiene una interacción más fuerte con la fase estacionaria. Mediante la rotación de las diversas columnas usadas en la dirección indicada, se simula un movimiento del lecho en una dirección opuesta a la fase móvil.

Además, dado que la invención produce una mejora significativa en la eficiencia de separación y una reducción en el tamaño del equipamiento, las fases estacionarias (tales como las resinas) que hasta ahora se consideraban inapropiadas para aplicaciones industriales a gran escala ahora pueden considerarse como posibles candidatas para la fase estacionaria. En consecuencia, la invención amplía el espectro de las técnicas de separación cromatográfica industrial.

El término "fase móvil", como se usa en esta solicitud, pretende referirse a la parte del sistema cromatográfico que transporta la mezcla de alimentación a través de la fase estacionaria. La fase móvil es, preferentemente, un fluido y, por lo tanto, puede ser líquida o gaseosa. Las fases móviles líquidas se usan para ajustar la separación y la retención cromatográfica en la cromatografía líquida. La temperatura de una fase móvil gaseosa se usa para ajustar la retención en la cromatografía de gases.

El término "fase estacionaria", como se usa en esta solicitud, pretende referirse a la parte del sistema cromatográfico a través del cual fluye la fase móvil y donde se produce la distribución de la mezcla de alimentación entre las fases.

El término "extracto", como se usa en esta solicitud, pretende referirse al(a los) componente(s) que se adsorbe(n) o se retarda(n) más en la fase estacionaria.

El término "refinado", como se usa en esta solicitud, pretende referirse al(a los) componente(s) que se adsorbe(n) o se retarda(n) menos en la fase estacionaria.

De acuerdo con la invención, una fase móvil y una mezcla de alimentación se aplican a un lecho móvil simulado. La cromatografía de lecho móvil simulado se conoce (*por ejemplo*, Juza y otros, Trends in Biotechnology 2000, 18(3), 108-118) y se usa para implementar una aproximación muy cercana de la cromatografía de lecho móvil verdadero imaginaria. Implica la simulación de la fase estacionaria mediante el uso de múltiples columnas conectadas en serie en un bucle, con el movimiento periódico de los puertos de entrada y salida a las columnas en la misma dirección que el flujo del fluido.

La fase móvil puede ser un fluido, tal como un líquido. Típicamente, la fase móvil comprende uno o más solventes. Opcionalmente, la fase móvil puede aplicarse como un gradiente, tal como un gradiente de sal, un gradiente de pH o un gradiente de solvente. En una modalidad, la fase móvil consiste en solvente. Preferentemente, la fase móvil comprende uno o más solventes que se usan comúnmente en la cromatografía líquida y se clasifican como solventes de grado alimenticio. Preferentemente, la fase móvil comprende uno o más solventes seleccionados del grupo que consiste en agua, alcoholes monohídricos (tales como metanol, etanol, propanol, butanol), alcoholes polihídricos (tales como glicerol, propilenglicol), poliéteres (tales como el polietilenglicol) y alcanos (tales como el hexano). En una modalidad, la fase móvil comprende uno o más solventes orgánicos seleccionados del grupo que consiste en metanol, etanol, propanol y butanol. En una modalidad, la fase móvil comprende agua.

La mezcla de alimentación es soluble en la fase móvil. En una modalidad preferida, la mezcla de alimentación se disuelve completamente en la fase móvil. La mezcla de alimentación puede comprender dos o más componentes. Preferentemente, la mezcla de alimentación no comprende más de 50 componentes. En una modalidad, la mezcla de alimentación comprende 2-25 componentes. La mezcla de alimentación puede comprender uno o más componentes orgánicos. Dichos

componentes son típicamente de origen orgánico y pueden presentarse en corrientes de proceso en la industria agroalimentaria, la industria biotecnológica y la industria de biorrefinamiento. Algunos ejemplos de dichos componentes orgánicos incluyen componentes seleccionados del grupo que consiste en péptidos, proteínas, oligosacáridos, sales, azúcares, ácidos orgánicos, alcaloides, polifenoles y vitaminas. La mezcla de alimentación puede, por ejemplo, comprender una o más mezclas seleccionadas del grupo que consiste en una mezcla de sales y proteínas, una mezcla de azúcares y proteínas, una mezcla de azúcares y sales, una mezcla de dos o más oligosacáridos, una mezcla de dos o más proteínas, y una mezcla de azúcares y ácidos. La presente invención puede usarse ventajosamente para los procesos de separación de alimentos. En consecuencia, preferentemente, uno o más componentes en la mezcla de alimentación son comestibles, y con mayor preferencia, la mezcla de alimentación es comestible. El término "comestible", como se usa en esta solicitud, pretende incluir cualquier cosa que pueda consumirse, comerse, beberse o ingerirse de cualquier otra manera. En consecuencia, una mezcla de alimentación comestible es una mezcla de componentes que pueden estar en forma sólida, en forma disuelta o líquida, en forma cristalina o en cualquier otra forma y pueden consumirse, comerse, beberse, o ingerirse de cualquier otra manera.

Aunque, de acuerdo con la invención, la mezcla de alimentación se separa en un extracto y un refinado, es posible con la invención separar más de dos componentes (separación multicomponente) mediante el uso de lechos móviles simulados de múltiples secciones extendidas o mediante el uso de múltiples sistemas de lechos móviles simulados en serie. Por ejemplo, el extracto y/o el refinado que resultan de una primera sección o sistema de lecho móvil simulado pueden enviarse a una sección o sistema de lecho móvil simulado subsecuente para una separación adicional. Típicamente, en dicha separación multicomponente, los lechos móviles simulados de múltiples secciones comprenderán el mismo tipo de fase estacionaria y la misma o una diferente fase móvil. Con respecto a los sistemas de lecho móvil simulado múltiples en serie, estos sistemas comprenderán típicamente el mismo o un tipo diferente de fase estacionaria y la misma o una diferente fase móvil. Además, otros parámetros del proceso (tales como las velocidades de flujo de líquido, los tiempos de intercambio de columna y la concentración de alimentación) pueden ajustarse para realizar un modo de operación diferente (tal como el intercambio de columna asíncrono, la modulación de las tasas de flujo y la modulación de la concentración de alimentación).

En una modalidad, la fase móvil y/o la mezcla de alimentación se aplican continuamente al lecho móvil simulado para permitir un funcionamiento continuo del proceso de la invención.

La mezcla de alimentación se separa en el proceso de la invención en un extracto y un refinado, que se recolectan, preferentemente, por separado.

El lecho móvil simulado usado en el proceso de la invención comprende múltiples columnas conectadas en serie en un bucle. Esto significa que la salida de cada columna se conecta a la entrada de la columna siguiente y todas las columnas se enlazan de esta manera en un bucle. La cantidad de columnas determina en qué medida se aproxima a un lecho móvil verdadero. El uso de más columnas simula más fielmente un lecho móvil verdadero, pero tiene la desventaja de que requiere espacio y equipamiento. Preferentemente, se aplican 4-24 columnas en serie, con mayor preferencia 4-16 columnas, tales como 4-12 columnas. Cada una de las columnas se empaqueta con el mismo tipo de fase estacionaria.

De acuerdo con el proceso de la invención, las múltiples columnas son columnas de flujo radial. Esta es una modalidad ventajosa particularmente, ya que las columnas de flujo radial pueden combinar un área de aplicación grande con una altura de lecho pequeña (corresponde al grosor radial del lecho). En dependencia de la aplicación, el grosor radial puede variar ampliamente. Típicamente, sin embargo, el grosor radial puede estar adecuadamente en el intervalo de 0,5-40 cm, preferentemente, en el intervalo de 1-20 cm.

De acuerdo con la invención, la fase estacionaria comprende un particulado. El particulado puede ser sólido o poroso. La fase estacionaria particulada sólida puede comprender opcionalmente un líquido que se inmoviliza o adsorbe sobre las partículas.

La fase estacionaria particulada del lecho móvil simulado tiene un diámetro medio de partículas de 100 μm o menos, preferentemente, 80 μm o menos, con mayor preferencia, 60 μm o menos. En una modalidad, la fase estacionaria particulada tiene un diámetro medio de partículas en el intervalo de 5-100 μm , con mayor preferencia, en el intervalo de 5-60 μm , tal como en el intervalo de 10-35 μm . El término "diámetro de partícula", como se usa en esta solicitud, pretende referirse a un diámetro esférico equivalente, que es el diámetro de una esfera de volumen equivalente. Por lo tanto, en el caso de que las partículas sean esféricas, entonces el diámetro de partícula corresponde al diámetro real de la partícula esférica.

El tamaño medio de partículas de la fase estacionaria del lecho móvil simulado se define en términos de d_{50} , en donde d_{50} es el diámetro de partícula donde el 50 por ciento del volumen de la distribución se encuentra más abajo de este valor. Este parámetro puede medirse adecuadamente mediante el uso de, por ejemplo, difracción láser, y es uno de los parámetros más significativos para las distribuciones de tamaño de partícula.

La distribución del tamaño de partícula de la fase estacionaria del lecho móvil simulado puede definirse en términos de d_{10} y d_{90} , en donde d_{10} es el diámetro de partícula donde el 10 por ciento del volumen de la distribución se encuentra más abajo de este valor y en donde d_{90} es el diámetro de partícula en donde el 90 por ciento del volumen de la distribución se

encuentra más abajo de este valor. Estos parámetros pueden medirse adecuadamente mediante el uso de, por ejemplo, difracción láser. La relación entre d_{90} y d_{10} , d_{90}/d_{10} se correlaciona con el ancho de distribución del tamaño de partícula y es una indicación de la uniformidad de la distribución del tamaño de partícula y de su rendimiento de separación. En una modalidad preferida de la invención, la distribución del tamaño de partícula de la fase estacionaria particulada se especifica mediante una $d_{90}/d_{10} \leq 2$ y/o una $d_{60}/d_{10} \leq 1,7$. En una modalidad, la d_{90}/d_{10} de la fase estacionaria particulada del lecho móvil simulado es 2 o menos, preferentemente, 1,95 o menos, con mayor preferencia, 1,9 o menos. En una modalidad, la d_{60}/d_{10} de la fase estacionaria particulada del lecho móvil simulado es 1,7 o menos, preferentemente, 1,65 o menos, con mayor preferencia, 1,6 o menos, en donde d_{60} es el diámetro de partícula donde el 60 por ciento del volumen de la distribución se encuentra más abajo de este valor.

Los diámetros de partícula y las distribuciones de tamaño de partícula (PSD, por sus siglas en inglés) como se mencionan en la presente descripción pueden determinarse adecuadamente por difracción láser. Esta técnica, también conocida como dispersión de luz estática, se ha convertido en el método dominante usado en la determinación industrial de la PSD. Los resultados se informan sobre la base del volumen de diámetro esférico equivalente.

La fase estacionaria puede comprender una resina de exclusión por tamaño, una resina de exclusión de iones, una resina de intercambio iónico y/o un adsorbente. Los ejemplos de fases estacionarias particuladas adecuadas incluyen una o más seleccionadas del grupo que consiste en resinas inorgánicas (tales como resinas basadas en zeolita, resinas basadas en sílice), resinas basadas en polímeros orgánicos (tales como polímeros basados en metacrilato, polímeros basados en poliestireno-divinilbenceno, polímeros basados en acrilamida), resinas basadas en agarosa, resinas basadas en dextrano y resinas basadas en celulosa.

Normalmente, se usa un solo tipo de fase estacionaria (es decir, un solo tipo de partículas) para una separación específica.

El proceso de la invención puede ventajosamente realizarse continuamente. Sin embargo, es posible además realizar una separación por lotes, si se desea.

El proceso de la invención puede controlarse bien por medio de varios parámetros que pueden ajustarse (incluso con un tipo predeterminado de fase estacionaria y el grosor radial de las columnas). Estos parámetros, por ejemplo, incluyen las tasas de flujo del líquido, el tiempo de intercambio (que es inversamente proporcional a la tasa de flujo sólido (fase estacionaria)) y la concentración de los componentes que necesitan separarse. El proceso puede optimizarse en dependencia de la aplicación y los deseos específicos del usuario (tales como la productividad por día, la pureza mínima de las corrientes de productos, la dilución mínima de las corrientes de productos y la recuperación mínima de las especies a separar). Dicho nivel de control sobre el proceso es altamente ventajoso y permite un ajuste exacto del proceso a las necesidades del usuario.

Las separaciones que pueden realizarse adecuadamente con el proceso de la invención incluyen, por ejemplo, eliminación de sal, recuperación de azúcar, fraccionamiento de oligosacáridos, fraccionamiento de péptidos y/o fraccionamiento de proteínas.

En un aspecto adicional, la invención se dirige a un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado adecuado para llevar a cabo el proceso de la invención.

En una modalidad, el aparato comprende un bucle de múltiples columnas conectadas en serie, cada columna comprende una fase estacionaria particulada, en donde una o más de dichas columnas son columnas de flujo radial, y en donde dicho bucle comprende, cada uno entre dos columnas separadas, una entrada para la mezcla de alimentación, una salida para el extracto, una entrada para el eluyente y una salida para el refinado, en donde las entradas y salidas pueden intercambiarse ocasionalmente de forma giratoria sobre el bucle de manera que cada una de las entradas y salidas cambia desde una primera posición entre dos columnas separadas hasta una segunda posición entre dos columnas diferentes, y en donde la fase estacionaria particulada de dicho lecho móvil simulado tiene un diámetro medio de partículas de 100 μm o menos. En esta modalidad, el aparato de la invención tiene posiciones fijas para las columnas y las entradas y salidas se intercambian ocasionalmente de forma giratoria sobre el bucle para crear un lecho móvil simulado. Por lo tanto, en esta modalidad, las entradas y salidas giran, en efecto, sobre el bucle fijo de múltiples columnas.

En una modalidad alternativa, el aparato adecuado para llevar a cabo el proceso de la invención comprende un bucle de múltiples columnas conectadas en serie, cada columna comprende una fase estacionaria particulada, en donde una o más de dichas columnas son columnas de flujo radial, y en donde dicho bucle comprende, cada una entre dos columnas separadas, una entrada para la mezcla de alimentación, una salida para el extracto, una entrada para el eluyente y una salida para el refinado, en donde el bucle de múltiples columnas puede intercambiarse de forma rotatoria de manera que cada una de las entradas y las salidas cambia desde una primera posición entre dos columnas separadas a una segunda posición entre dos columnas diferentes, y en donde la fase estacionaria particulada de dicho lecho móvil simulado tiene un diámetro medio de partículas de 100 μm o menos. En esta modalidad, el aparato de la invención tiene posiciones fijas para las entradas y salidas y los bucles de las columnas se intercambian ocasionalmente de forma giratoria a lo largo del bucle de entradas y salidas para crear un lecho móvil simulado. Por lo tanto, en esta modalidad, el bucle de múltiples columnas giran, en efecto, sobre las entradas y salidas fijadas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Cálculo de la reducción de tamaño potencial

5 La posible reducción de tamaño se calculó al asumir un número de HETP (por sus siglas en inglés, altura equivalente a las placas teóricas) (para garantizar el mismo rendimiento) y caída de presión total constante.

10 Para una presión dada, existe una relación entre el diámetro de partícula y la velocidad (basado en la ecuación de Ergun-Blake-Kozeny). Para una cantidad dada de unidades de transferencia, existe además una relación entre el diámetro de partícula y la velocidad (derivado a partir de la ecuación de Van Deemter, como se describió por Gritti y Guiochon en Journal of Chromatography A 2012, 1221, 2-40). Estas correlaciones se visualizan en la figura 2, donde la longitud de la columna se representa como una función de la velocidad superficial para 300 µm y 15 µm. Para la línea de puntos la caída de presión total es constante, mientras que para la línea continua el número de unidades de transferencia es constante. En el punto de cruce, la combinación de velocidad y diámetro de partícula puede determinarse, donde la presión y el número de unidades de transferencia tienen el valor requerido.

15 Para combinaciones diferentes de unidades de transferencia total (200, 500 y 750) y presión total (1 y 10 bar), se calculó la reducción de volumen del sistema, al pasar de 300 a 120, 15 y 5 µm. La figura 3 muestra la reducción de volumen del sistema con una presión total de columna y número de unidades de transferencia constante, con un punto de referencia a 300 µm. Este punto de referencia representa el tamaño de partícula de las resinas aplicadas en procesos de lecho móvil simulado a gran escala. La reducción de volumen es indiferente relativamente del número total de unidades de transferencia y la presión total. Puede realizarse una reducción de volumen entre 275-335 al pasar de partículas de 300 µm a 15 µm.

20 Los resultados se muestran en la tabla 1. Es posible reducir el volumen del sistema con un factor de 264 al pasar de un diámetro de partícula de 300 µm a 15 µm. Se obtuvieron los mismos resultados para un número total de HETP (200 y 750) y presiones totales (0,1 y 10 bar) diferentes.

Tabla 1 Reducción de tamaño a caída de presión total constante. El número total de HETP es 500.

30

d_p [µm]	P_{tot} [bar]	v_{sup} [cm/h]	L [m]	Factor [-]
15	1	430	0,022	264
30	1	470	0,082	78
120	1	515	1,2	6
300	1	530	7,2	1

35

40 En la tabla 1, d_p es el diámetro de partícula, P_{tot} es la caída de presión total, v_{sup} es la velocidad superficial, L es la altura del lecho (el eluyente corre de 0 a L) y Factor es la reducción de tamaño con relación a 300 µm.

Ejemplo 2: Cálculo de dimensiones de columna

45 Además de los resultados presentados en el ejemplo 1, las dimensiones de la columna se determinaron para caídas de presión total diferentes, al asumir un número constante de HETP. Las dimensiones se calcularon tanto para columnas de flujo radial como de flujo axial. La geometría de ambos tipos de columnas se resume en la figura 4.

50 Para caídas de presión total diferentes (1, 10 y 100 bar) y diámetros de partícula de resina diferentes (300, 120, 30 y 15 µm) se calcularon las dimensiones de una configuración de columna radial y axial. El flujo de alimentación líquido se fijó a 25 m³/h. Los resultados se muestran en la tabla 2. En esta tabla solo se presentan las dimensiones de columna que son relevantes para la implementación en una escala de producción industrial. La geometría de columna industrial se especifica como límites inferior y superior (fila en la parte inferior en la tabla 2). En esta tabla puede verse que partículas de resina pequeñas (< 120 µm) pueden aplicarse tanto en configuraciones de columnas radiales como axiales, en dependencia de la caída de presión total.

55

Tabla 2 Dimensiones de las columnas para columnas radiales y axiales a caídas de presión total diferentes. El número total de HETP es 500.

60

P_{tot}	d_p	columna radial		columna axial	
		L	H_r	L	$2 \cdot r_a$
[bar]	[µm]	[m]	[m]	[m]	[m]
1	15				
1	30	0,08	5,2		

65

ES 2 730 403 T3

	1	120			1,2	2,5
	1	300			7,2	2,5
5	10	15	0,06	2,1		
	10	30	0,24	0,52	0,24	1,4
	10	120			3,6	1,4
10	10	300				
	100	15	0,18	0,21	0,18	0,78
	100	30			0,72	0,78
15	100	120			11	0,77
	100	300				
	Intervalo		0,02-0,5	0,1-5	0,2-10	0,5-2,5

20 En la tabla 2, P_{tot} es la caída de presión total, d_p es el diámetro de partícula, L es la altura del lecho de la columna (el eluyente corre de 0 a L), H_r es la altura de la columna, y r_a es el radio de la columna axial.

Reivindicaciones

1. Proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado, que comprende las etapas de aplicar una mezcla de alimentación y una fase móvil en la que dicha mezcla de alimentación es soluble, a un lecho móvil simulado que comprende una fase estacionaria particulada, y separar dicha mezcla de alimentación en un extracto y un refinado, en donde dicho lecho móvil simulado comprende múltiples columnas de flujo radial conectadas en serie en un bucle, y en donde la fase estacionaria particulada de dicho lecho móvil simulado tiene un diámetro medio de partículas de 100 μm o menos.
2. Proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado de conformidad con la reivindicación 1, en donde la fase estacionaria particulada tiene un diámetro medio de partículas en el intervalo de 5-100 μm , preferentemente, 5-60 μm , con mayor preferencia, 10-35 μm .
3. Proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde dichas partículas tienen
 - (i) una d_{90}/d_{10} de 2 o menos, preferentemente, 1,95 o menos, aún con mayor preferencia, 1,9 o menos; y/o
 - (ii) una d_{60}/d_{10} de 1,7 o menos, preferentemente, 1,65 o menos, con mayor preferencia, 1,6 o menos.
4. Proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha fase móvil es un fluido.
5. Proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dichas partículas son sólidas o porosas, preferentemente, dichas partículas comprenden un líquido que se inmoviliza o se adsorbe sobre las partículas.
6. Proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicha fase estacionaria comprende una o más seleccionadas del grupo que consiste en resinas inorgánicas, tales como resinas basadas en zeolita, resinas basadas en sílice; resinas basadas en polímeros orgánicos, tales como polímeros basados en (met)acrilato, polímeros basados en poliestireno-divinilbenceno, polímeros basados en acrilamida; resinas basadas en agarosa; resinas basadas en dextrano; y resinas basadas en celulosa.
7. Proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicha mezcla de alimentación comprende 2-50 componentes, preferentemente, 2-25 componentes, con mayor preferencia, 2-10 componentes.
8. Proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicha mezcla de alimentación comprende una o más seleccionadas del grupo que consiste en péptidos, proteínas, oligosacáridos, sales, azúcares, ácidos orgánicos, alcaloides, polifenoles y/o vitaminas.
9. Proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicha fase móvil comprende uno o más solventes seleccionados del grupo que consiste en agua, alcoholes monohídricos, alcoholes polihídricos, poliéteres y alcanos.
10. Proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la cantidad de columnas conectadas en serie está en el intervalo de 4-24, preferentemente, 4-16, con mayor preferencia, 4-12.
11. Proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para la eliminación de sal, la recuperación de azúcar, el fraccionamiento de oligosacáridos, el fraccionamiento de péptidos y/o el fraccionamiento de proteínas.
12. Proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde dicho proceso es un proceso continuo.
13. Proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde dicho extracto y/o dicho refinado se somete a una etapa de separación adicional, tal como una etapa de separación cromatográfica adicional de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
14. Aparato cromatográfico de lecho móvil simulado adecuado para llevar a cabo el proceso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende un bucle de columnas de flujo radial conectadas en serie, cada columna comprende una fase estacionaria particulada, y en donde dicho bucle comprende, cada una entre

dos columnas separadas, una entrada para la mezcla de alimentación, una salida para el extracto, una entrada para el eluyente y una salida para el refinado, en donde

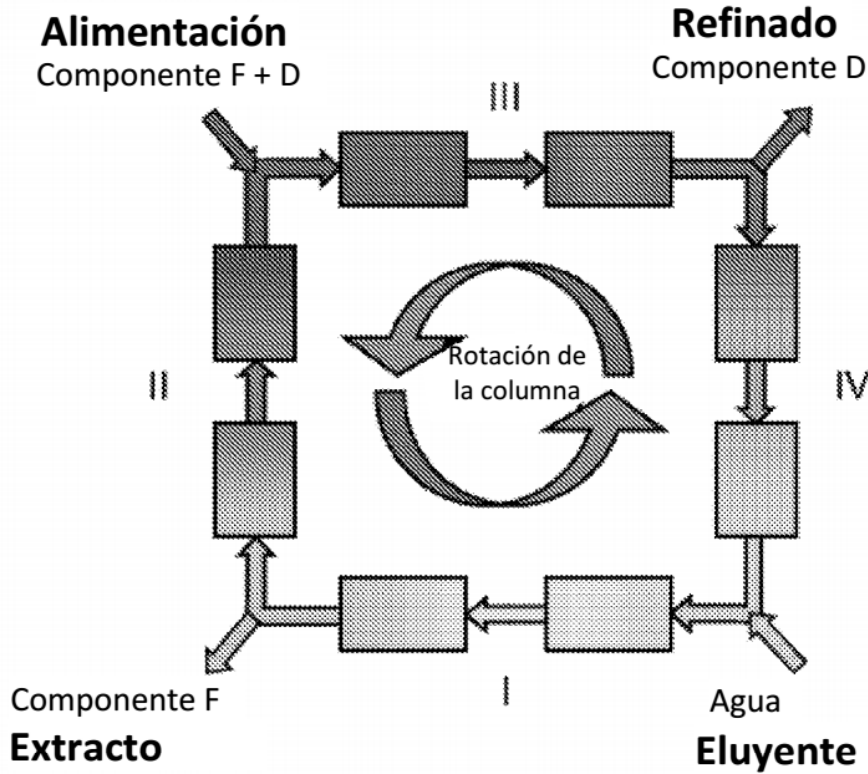
(a) las entradas y salidas pueden intercambiarse ocasionalmente de forma giratoria sobre el bucle, de manera que cada una de las entradas y salidas cambia de una primera posición entre dos columnas separadas a una segunda posición entre dos columnas diferentes, o

(b) el bucle de múltiples columnas puede intercambiarse ocasionalmente de forma giratoria de manera que cada una de las entradas y salidas cambia de una primera posición entre dos columnas separadas a una segunda posición entre dos columnas diferentes, y

en donde la fase estacionaria particulada de dicho lecho móvil simulado tiene un diámetro medio de partículas de 100 μm o menos.

15. Aparato cromatográfico de lecho móvil simulado de conformidad con la reivindicación 14, en donde el grosor radial de la fase estacionaria está en el intervalo de 0,5-40 cm, preferentemente, de 1-20 cm.

Figura 1



Componente F: interacción fuerte

Componente D: interacción débil

Figura 2

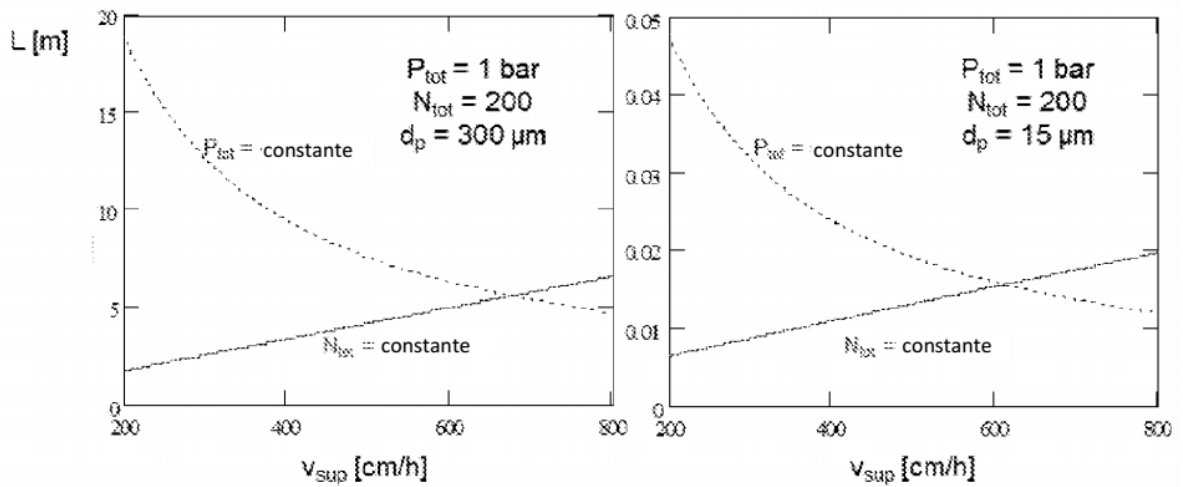


Figura 3

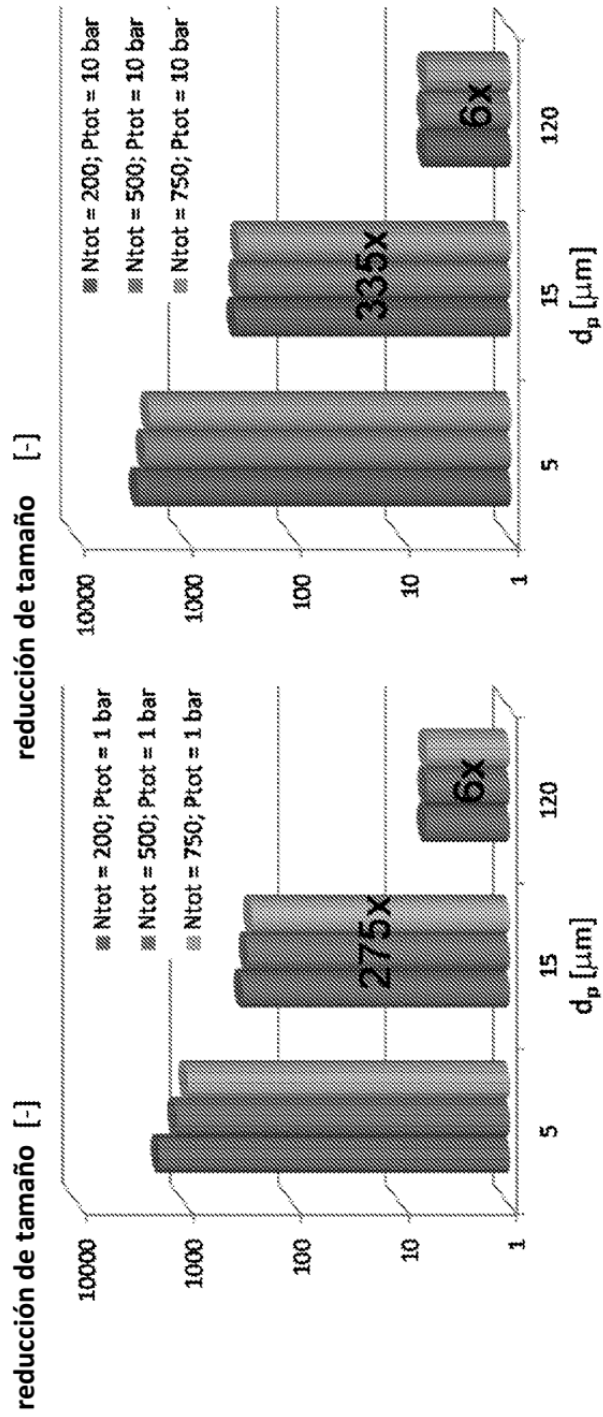
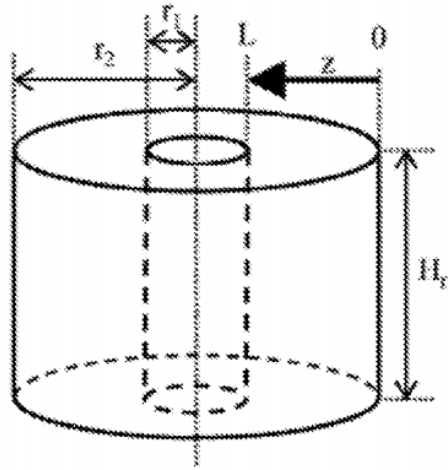
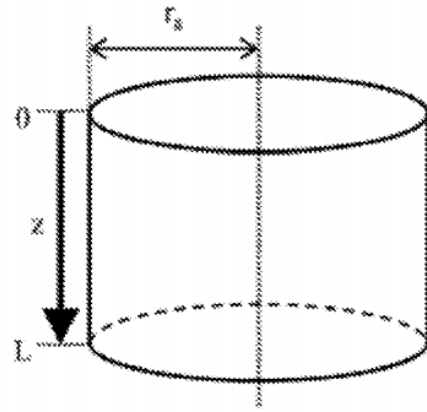


Figura 4



columna radial



columna axial